

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
der Universität Rostock

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. M. Tiedge

Thema

**Einfluss einer Cytochrom-c-Oxidase Mutation  
auf alterungsbedingte Adaptationsvorgänge  
im organspezifischen Zellstoffwechsel**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Medizin**

der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Lydia Wuchert-Wünnemann

Geboren am 05.01.1988 in Meiningen

Rostock, 05.12.2014

Gutachterin:

Prof. Dr. rer. nat. Simone E. Baltrusch

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Medizinische Fakultät der Universität Rostock

Schillingallee 70

18057 Rostock

- 1. Gutachter/-in:** Frau Prof. Dr. rer. nat. Simone Baltrusch  
Institut für Medizinische Biochemie und  
Molekularbiologie  
Schillingallee 70  
18057 Rostock
- 2. Gutachter/-in:** Herr Prof. Dr. med. Holger Willenberg  
Universitätsmedizin Rostock  
Endokrinologie/Stoffwechselerkrankungen  
Ernst-Heydemann Str. 6  
18057 Rostock
- 3. Gutachter/-in:** Prof. Dr. rer. nat. habil. Reinhard Walther  
Universitätsmedizin Greifswald  
Körperschaft des öffentlichen Rechts  
Institut für Medizinische Biochemie und  
Molekularbiologie  
Ferdinand-Sauerbruch-Straße  
17475 Greifswald

**Datum der Einreichung:** 05.12.2014

**Datum der Verteidigung:** 01.07.2015

## **Widmung**

“When I was 5 years old, my mother always told me that happiness was the key to life. When I went to school, they asked me what I wanted to be when I grew up. I wrote down ‘happy’. They told me I didn’t understand the assignment, and I told them they didn’t understand life.” (John Lennon)

In diesem Sinne, möchte ich diese Arbeit meinen Eltern widmen, die immer für mich da sind und mich unterstützt haben auf allen Wegen.

## Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Diabetes mellitus .....   | 1         |
| 1.1.1 Diabetes mellitus Typ I .....                                       | 3         |
| 1.1.2 Diabetes mellitus Typ II .....                                      | 4         |
| 1.2 Das Hormon Insulin .....  | 5         |
| 1.2.1 Insulinaufbau .....   | 5         |
| 1.2.2 Insulinsekretion .....  | 6         |
| 1.2.3 Insulinwirkung .....  | 7         |
| 1.3 Mitochondrien .....   | 10        |
| 1.3.1 Mitochondrienaufbau .....   | 10        |
| 1.4 Mitochondriale Atmungskette .....                                     | 12        |
| 1.4.1 Komplex I .....   | 13        |
| 1.4.2 Komplex II .....  | 13        |
| 1.4.3 Komplex III .....   | 14        |
| 1.4.4 Komplex IV .....  | 15        |
| 1.4.5 Komplex V .....   | 17        |
| 1.5 Reaktive Sauerstoffspezies .....                                      | 16        |
| 1.5.1 Superoxid-Dismutasen .....  | 20        |
| 1.5.2 Katalase .....  | 22        |
| 1.5.3 Einfluss von ROS auf Insulinsekretion und Insulinwirkung .....      | 22        |
| 1.6 Mitochondriale DNA .....  | 24        |
| 1.7 Mitochondriopathien .....   | 25        |
| 1.8 Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Cox3 .....                           | 28        |
| <b>2 Zielstellung der Arbeit</b>  | <b>30</b> |
| <b>3 Materialien und Methoden</b>   | <b>31</b> |
| 3.1 Materialien .....   | 31        |
| 3.1.1 Auflistung der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle ..... | 31        |
| 3.1.2 Methodenspezifische Antikörper und Sonden .....                     | 32        |
| 3.1.3 Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer .....               | 33        |
| 3.1.4 Geräte und Verbrauchsmittel .....                                   | 34        |
| 3.1.5 Messgeräte und Programme sowie deren Bezugsquelle .....             | 35        |
| 3.2 Verwendete Mausstämme und Tierhaltung .....                           | 36        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.1 Verwendete Mausstämme .....   | 36        |
| 3.2.2 Tierhaltung .....   | 38        |
| 3.3 Methodenbeschreibung .....  | 38        |
| 3.3.1 Bestimmung des Körpergewichts .....                                     | 38        |
| 3.3.2 Bestimmung der Blutglukosekonzentration .....                           | 38        |
| 3.3.3 Isolierung der Pankreasinseln .....                                     | 39        |
| 3.3.4 Entnahme weiterer Organe .....  | 41        |
| 3.3.5 Messung der Insulinsekretion .....                                      | 42        |
| 3.3.5.1 Ex vivo Stimulation der isolierten Pankreasinseln .....               | 42        |
| 3.3.5.2 Bestimmung Insulinkonzentration mittels ELISA .....                   | 42        |
| 3.3.6 mRNA-Expressionsanalysen .....  | 44        |
| 3.3.6.1 RNA-Extraktion aus den Geweben .....                                  | 44        |
| 3.3.6.2 RNA-Extraktionen aus Langerhans'schen Inseln .....                    | 45        |
| 3.3.6.3 cDNA – Synthese: Erster Schritt der RT-qPCR .....                     | 45        |
| 3.3.6.4 Real-Time quantitative PCR (RT- qPCR) .....                           | 46        |
| 3.3.7 DNA Extraktion und Bestimmung der relativen mtDNA Kopienanzahl .....    | 49        |
| 3.3.7.1 DNA Extraktion aus Gewebeproben .....                                 | 49        |
| 3.3.7.2 Relative Bestimmung der mtDNA Kopienanzahl .....                      | 49        |
| <b>4 Resultate .....</b>  | <b>50</b> |
| 4.1 Gewicht .....   | 50        |
| 4.2 Blutglukosekonzentration .....  | 51        |
| 4.3 Insulinsekretion .....  | 52        |
| 4.3.1. Basalsekretion der Inseln .....  | 52        |
| 4.3.2. Stimulation der Inseln mit 20 mM Glukose-Lösung .....                  | 52        |
| 4.4 Genexpressionsanalysen .....  | 54        |
| 4.4.1 Genexpressionsanalysen in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen ..... | 54        |
| 4.4.1.1 Cytochrom c1-Expression in der Leber .....                            | 54        |
| 4.4.1.2 Cox6b1-Expression in der Leber .....                                  | 55        |
| 4.4.1.3 UCP2-Expression in der Leber .....                                    | 56        |
| 4.4.1.4 SOD1-Expression in der Leber .....                                    | 57        |
| 4.4.1.5 SOD2-Expression in der Leber .....                                    | 58        |
| 4.4.1.6 Katalase-Expression in der Leber .....                                | 59        |
| 4.4.1.7 Tfam-Expression in der Leber .....                                    | 60        |
| 4.4.1.8 Pyruvatcarboxylase-Expression in der Leber .....                      | 61        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.4.1.9 COX1-Expression in der Leber .....                                       | 62        |
| 4.4.2 Genexpressionsanalysen im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen .....       | 64        |
| 4.4.2.1 Cytochrom c1-Expression im Gehirn .....                                  | 64        |
| 4.4.2.2 Cox6b1-Expression im Gehirn .....  | 64        |
| 4.4.2.3 UCP2-Expression im Gehirn .....  | 65        |
| 4.4.2.4 SOD1-Expression im Gehirn .....  | 66        |
| 4.4.2.5 SOD2-Expression im Gehirn .....  | 66        |
| 4.4.2.6 Katalase-Expression im Gehirn .....                                      | 67        |
| 4.4.2.7 Tfam-Expression im Gehirn .....  | 68        |
| 4.4.2.8 Pyruvatcarboxylase-Expression im Gehirn .....                            | 69        |
| 4.4.2.9 COX1-Expression im Gehirn .....  | 69        |
| 4.4.3 Genexpressionsanalysen im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen .....       | 70        |
| 4.4.3.1 Cytochrom c1-Expression im Muskel .....                                  | 70        |
| 4.4.3.2 Cox6b1-Expression im Muskel .....  | 71        |
| 4.4.3.3 UCP2-Expression im Muskel .....  | 72        |
| 4.4.3.4 SOD1-Expression im Muskel .....  | 72        |
| 4.4.3.5 SOD2-Expression im Muskel .....  | 73        |
| 4.4.3.6 Katalase-Expression im Muskel .....                                      | 74        |
| 4.4.3.7 Tfam-Expression im Muskel .....  | 74        |
| 4.4.3.8 Pyruvatcarboxylase-Expression im Muskel .....                            | 75        |
| 4.4.3.9 COX1-Expression im Muskel .....  | 76        |
| 4.4.4 Genexpressionanalysen isolierter Inseln aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen .... | 77        |
| 4.4.4.1 Cytochrom c1-Expression isolierter Inseln .....                          | 77        |
| 4.4.4.2 Cox6b1-Expression isolierter Inseln .....                                | 78        |
| 4.4.4.3 UCP2-Expression isolierter Inseln .....                                  | 78        |
| 4.4.4.4 SOD1-Expression isolierter Inseln .....                                  | 79        |
| 4.4.4.5 Tfam-Expression isolierter Inseln .....                                  | 80        |
| 4.4.4.6 Pyruvatcarboxylase-Expression isolierter Inseln .....                    | 80        |
| 4.4.4.7 COX1-Expression isolierter Inseln .....                                  | 81        |
| 4.5 mtDNA-Gehalt der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen.....                    | 82        |
| <b>5 Diskussion</b>  | <b>83</b> |
| 5.1 Vergleich von 3 Monate alten B6mtNOD Mäusen mit dem Hintergrundstamm         |           |
| B6NTac .....   | 84        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.2 Vergleich von 6 Monate alten B6mtNOD Mäusen mit dem Hintergrundstamm  |            |
| B6NTac .....  | 86         |
| 5.3 Vergleich von 12 Monate alten B6mtNOD Mäusen mit dem Hintergrundstamm |            |
| B6NTac .....  | 88         |
| 5.4 Ausblick .....  | 90         |
| <b>6 Zusammenfassung</b>  | <b>92</b>  |
| <b>7 Thesen</b>   | <b>95</b>  |
| <b>8 Literaturverzeichnis</b> .....                                       | <b>97</b>  |
| <b>9 Abkürzungsverzeichnis</b> .....                                      | <b>110</b> |
| Anhang .....  | 113        |
| Selbstständigkeitserklärung .....   | 114        |
| Danksagung .....  | 115        |
| Lebenslauf .....  | 116        |

## 1 Einleitung

### 1.1 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die nach der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) durch eine chronische Hyperglykämie charakterisiert ist. Zugrunde liegen entweder eine gestörte Insulinsekretion, eine verminderte Wirkung von Insulin oder beides zusammen (Schleicher, E. & Landgraf, R. 2011). Nach Angaben der Internationalen Diabetes Föderation (IDF) waren 2010 weltweit 6,6 % der Weltbevölkerung zwischen 20 und 79 Jahren an Diabetes erkrankt. Schätzungen zur Folge soll der Wert 2030 sogar bis auf 7,8 % ansteigen. In Deutschland geht man von 6 Millionen an Diabetes mellitus erkrankten Menschen aus, mit dem höchsten Prozentsatz in der Altersgruppe der 60- bis 79-Jährigen (IDF 2011).

Bezüglich der Klassifikation und der Diagnostik des Diabetes mellitus wurden bereits 1985 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) Empfehlungen ausgesprochen, welche 1997 von der Amerikanischen Diabetes Gesellschaft (ADA) nochmals abgeändert worden sind (Pfohl, M. 2002). Das Syndrom des Diabetes mellitus wird hierbei in vier Gruppen unterteilt (Tabelle 1). Mit einem Anteil von 85-95 % ist der Typ II Diabetes mellitus (T2DM) bei weitem die häufigste Form, gefolgt von Typ I Diabetes mellitus (T1DM) (IDF 2011).

|             |   |
|-------------|---|
| <b>I</b>    | <b>Diabetes mellitus Typ 1</b><br>(Beta-Zellzerstörung mit daraus resultierendem absoluten Insulinmangel, Insulinunabhängigkeit)<br>A. immunologisch vermittelt<br>B. idiopathisch  |
| <b>II.</b>  | <b>Diabetes mellitus Typ 2</b><br>(Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz)   |
| <b>III.</b> | <b>Andere Formen</b><br>A. Genetische Defekte der Beta-Zellfunktion<br>B. Genetische Defekte der Insulinwirkung<br>C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas<br>D. Endokrinopathien<br>E. Medikamenten- oder chemikalieninduzierte Formen<br>F. Infektionen<br>G. Seltene Formen des immunvermittelten Diabetes mellitus |
| <b>IV.</b>  | <b>Schwangerschaftsdiabetes mellitus</b>  |

**Tabelle 1: Klassifikation des Diabetes mellitus** (Quelle: Report of the expert comitee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus 2003) (Badenhoop, K. et al. 2011)

Komplikationen im Verlauf der diabetischen Erkrankung können in allen Organsystemen vorkommen und zu einer herabgesetzten Lebenserwartung führen. Besonders häufig treten die diabetische Nephropathie, Retinopathie, Neuropathie sowie kardiovaskuläre Schädigungen auf (Starke, A.A.R. Kapitel 22, 2000). Hierbei stehen vor allem mikro-



## 1 Einleitung

vaskuläre und makrovaskuläre Schädigungen der Gefäße, die alle wichtigen Funktionen des Gefäßsystems treffen können, im Vordergrund (Bierhaus, A. & Nawroth, P.P. 1999). Ursächlich geht man von verschiedenen pathologischen Prozessen aus, deren gemeinsamer Knotenpunkt in der erhöhten Blutglukosekonzentration liegt (Abb. 1) (Staiger, H. & Schleicher, E. 2011).

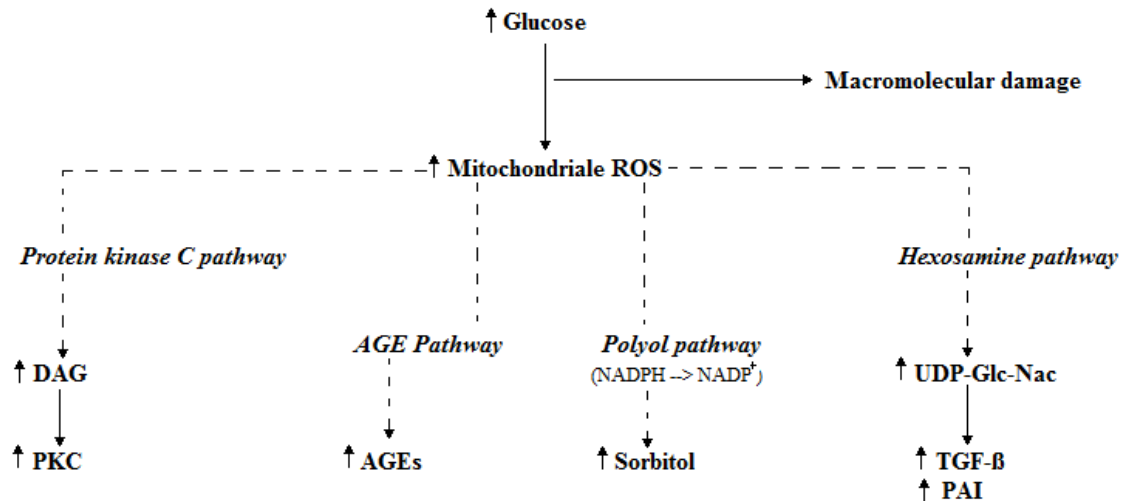


Abb. 1: Durch Hyperglykämie induzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) Bildung und dadurch aktivierte pathologische Signalwege (— = direkte Rolle; --- = indirekte Rolle). Uridindiphosphat (UDP); O-gebundenes N Acetylglukosamin (GlcNac); Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI); Transformierender Wachstums-Faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ); Advanced Glycation Endproducts (AGE); Diacylglycerin (DAG); Proteinkinase C (PKC) (Rolo, A.P. & Palmeira, C.M. 2006).

Durch vermehrten Einbau insulinunabhängiger Glukosetransporter steigt die Glukoseaufnahme der Zellen. Es kommt zu einer erhöhten intrazellulären Glukosekonzentration, sodass neben der Glykolyse andere Glukosestoffwechselwege getriggert werden (Staiger, H. & Schleicher, E. 2011). Hierdurch kommt es beispielsweise zu einer Abnahme des intrazellulären Pools an NADPH, welches für die Entgiftung der Zelle von gefährlichen reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygene species = ROS) benötigt wird. Darüber hinaus steigt die NADH/NAD<sup>+</sup>-Ratio durch den Verbrauch an NAD<sup>+</sup>, was eine verminderte Zellfunktion durch Beeinträchtigung des metabolischen bzw. signaltransduzierenden Systems nach sich zieht (Lorenzi, M. 2007). Durch die gesteigerte Glukosekonzentration kommt es zudem sowohl intra- wie auch extrazellulär zu einer Glykosilierung von Proteinen, Phospholipiden und Nukleinsäuren (Bierhaus, A. & Nawroth, P.P. 1999). Ein Folgeprodukt dieser Glykosilierung sind die Advanced Glycation Endproducts (AGE), die zu einer irreversiblen Quervernetzung von Makromolekülen (z.B. Kollagen) führen und damit deren Eigenschaften verändern

können (Bierhaus, A. & Nawroth, P.P. 1999; Staiger, H. & Schleicher, E. 2011). Zudem binden AGEs unter anderem an den Rezeptor für AGE-Produkte (RAGE). Es kommt zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase, durch die eine gesteigerte intrazelluläre ROS Produktion induziert wird (Staiger, H. & Schleicher, E. 2011). Eine mögliche Folge ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Nukleärer Faktor-kappa B) (Bierhaus, A. & Nawroth, P.P. 1999). In Untersuchungen zeigte sich, dass NF- $\kappa$ B eine Reihe von Genen modifiziert, darunter auch solche, die für die zelluläre Abwehr eine wichtige Rolle spielen, wie etwa die Mangan-gebundene Superoxid Dismutase (MnSOD) (Patel, S. & Santai, D. 2009).

### **1.1.1 Diabetes mellitus Typ I**

Vom Diabetes mellitus Typ I (T1DM) sind besonders junge Menschen, mit biphasischem Manifestationsgipfel um das 4. und 11. Lebensjahr betroffen (Clemens, A. et al. 1999). Eine Ausprägung im Erwachsenenalter als latenter autoimmun Diabetes (latent autoimmune diabetes in adults = LADA) ist ebenfalls möglich (Heidemann, C. et al. 2011). Hauptursache des T1DM ist eine autoimmunvermittelte Zerstörung der  $\beta$ -Zell-Funktion in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas mit nachweisbarer Infiltration von autoreaktiven T-Lymphozyten (Herold, G. et al. 2010). Dies führt zu einer Abnahme bis zum vollkommenen Verlust der Insulinproduktion. In seltenen Fällen liegt eine idiopathische Zerstörung oder ein Defekt der  $\beta$ -Zellen zu Grunde (Maahs, D.M. et al. 2010). Die für den T1DM typischen Symptome, darunter eine sich innerhalb von Tagen bis wenigen Wochen entwickelnde Gewichtsabnahme in Verbindung mit Exsikose, Polydypsie und Polyurie, manifestieren sich jedoch erst nach einem Verlust der  $\beta$ -Zellmasse von 80-90 % (Kolb, H. 2000; Scherbaum, W.A. & Gries, F.A. 2004). Des Weiteren mündet der progrediente Insulinmangel in einer katabolen Stoffwechselentgleisung, wodurch der Abbau von Eiweiß- und Muskelmasse begünstigt wird (Berger, M. 2000). Hinzu kommen Allgemeinsymptome wie Müdigkeit und Konzentrationschwäche (Gries, F.A. & Hauner, H. 2004).

In der Pathogenese geht man von einer multifaktoriellen Genese aus, bei der es zu einem Zusammenspiel zwischen Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition kommt. Bei letzterem nehmen vor allem die genetischen Merkmale im Humanen-Leukozyten-Antigen-System (HLA-System) eine wichtige Rolle ein (Kolb, H. 2000).

### **1.1.2 Diabetes mellitus Typ II**

Der Diabetes mellitus Typ II (T2DM) zählt zu den häufigsten Erkrankungen weltweit, mit weiter steigender Tendenz. Die größte Inzidenz für T2DM liegt, im Gegensatz zum Typ I, bei Menschen über 60 Jahren. Es zeigt sich jedoch in den letzten Jahren ein Anstieg an Diabetes mellitus Typ II erkrankter Kinder und Jugendlicher (Kellerer, M. & Häring, H.U. 2011). Hiervon zu unterscheiden ist der Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY-Diabetes), eine autosomal-dominant vererbte Form des Diabetes mellitus, die sich meist Anfang der 2. Lebensdekade bemerkbar macht (Teriverdian, G. & Buselmaier, W. 2004). Im Gegensatz zum Typ I Diabetiker kommt es beim Typ II Diabetes mellitus nur sehr selten zu einer Gewichtsabnahme. Auch Polydipsie und Polyurie manifestieren sich nur bei stark erhöhten Blutglukosewerten. Der Großteil der Patienten mit T2DM zeigt phänotypisch ein metabolisches Syndrom mit abdominal betonter, androider Adipositas (Gries, F.A. & Hauner, H. 2004). Pathognomisch kommt es beim T2DM zu einem Anstieg der Glukoseproduktion in der Leber, einer Beeinträchtigung der Insulinsekretion, sowie einer gestörten peripheren Insulinwirkung (Ichise, M. & Harris, P.E. 2010). Folge ist eine hyperglykämische Stoffwechsellage, deren mögliche Auswirkungen bereits erläutert worden sind.

Die Störung der intrazellulären Signalvermittlung von Insulin in den peripheren Geweben ergibt sich im Rahmen der Adipositas z.B. durch Down-Regulation des Insulinrezeptors oder Veränderungen in der Funktion der in der Zellmembran sitzenden Glukosetransporter. Weitere Resistenzmechanismen können sich aus Defekten innerhalb des Insulinrezeptors (Typ-A Insulinresistenz) oder massiv reduzierter Rezeptoraffinität (Typ-B Insulinresistenz) ergeben (Starke, A.A.R., Kapitel 34, 2000). Bei noch intakter Insulinproduktion zu Beginn der Erkrankung kann dies kompensatorisch zu einer erhöhten Insulinsekretion führen (Starke, A.A.R., Kapitel 34, 2000).

Bisher konnte noch keine direkte Ursache für die Ausbildung des Typ II Diabetes mellitus identifiziert werden. Man geht jedoch von einer multifaktoriellen Genese aus, bei der steigendes Alter, eine damit einhergehende verminderte Muskelmasse, Adipositas sowie exzessiver Kalorienkonsum verbunden mit der Abnahme an körperlicher Aktivitäten als wesentliche Faktoren für die Ausbildung des Typ II Diabetes angesehen werden können (Gunasekaran, U. & Gannon, M. 2011; Kellerer, M. & Häring, H.U. 2011). Zusätzlich könnte die altersbedingte Abnahme der  $\beta$ -Zell-Funktion mit steigendem Alter eine Rolle spielen (Gunasekaran, U. & Gannon, M. 2011). Weitere Studien zeigen, dass in gewissen Familien eine Häufung von Typ II Diabetes auftritt, sodass man neben

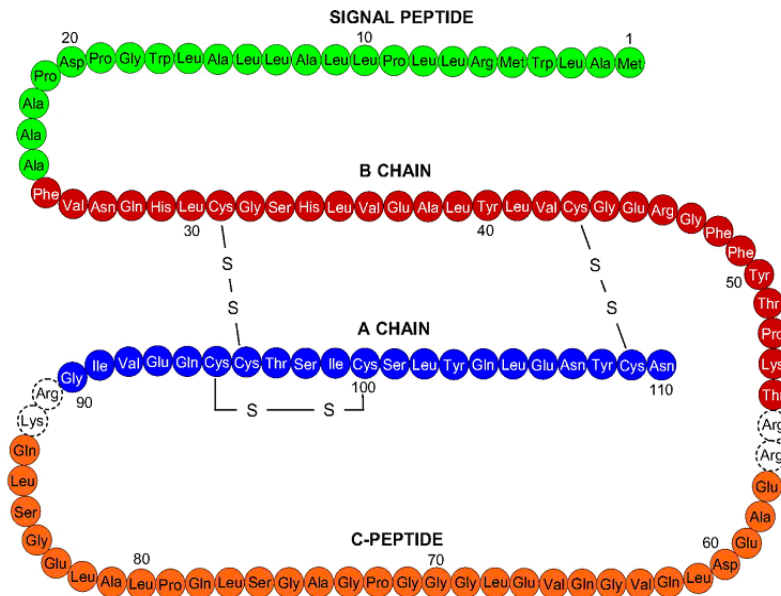
den oben genannten Risikofaktoren, auch von einer genetischen Disposition ausgehen kann (Grarup, N. et al. 2010).

### **1.2 Das Hormon Insulin**

Das Pankreas ist eine sekundär retroperitoneal gelegene Drüse, die aus einem endokrinen und einem exokrinen Anteil besteht (Aumüller, G. et al. 2007). Für die Insulinproduktion ist der endokrine Anteil des Pankreas, der nur knapp 2 % der Gesamtmasse des Organs ausmacht, von Bedeutung. Dieser besteht aus über 1 Millionen Langerhans'schen Inseln, welche vor allem in dessen Schwanzteil lokalisiert sind. Eine Insel an sich besteht aus tausenden von Epithelzellen und besitzt einen Durchmesser von etwa 100-200 µm. Die β-Zellen, in denen das Hormon Insulin gebildet wird, nehmen 70 % der Inselzellen ein (Lüllmann-Rauch, R. 2006).

#### **1.2.1 Insulinaufbau**

Insulin ist ein Makromolekül aus zwei Polypeptidketten: einer A-Kette aus 21 Aminosäuren, sowie einer B-Kette aus 30 Aminosäuren. Diese beiden Ketten sind kovalent über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Eine weitere Disulfidbrücke befindet sich innerhalb der A-Kette (Deutzmann, R., Kapitel 20, 2006). Der Genlocus ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 zu finden und codiert für das Präproinsulin mit einer 24 Aminosäuren langen Signalsequenz (Abb. 2) (Müller-Esterl, W. et al. 2011; Škrha, J. 2006). Nach Translation des Präproinsulins erfolgt der Transport in das Lumen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) der β-Zellen, in dem eine Prozessierung des Moleküls stattfindet (Škrha, J. 2006). Das noch gestreckte Präproinsulin wird durch Ausbildung dreier Disulfidbrücken gefaltet und nach Abspaltung der Signalsequenz als Proinsulin in den Golgi-Apparat transportiert (Škrha J. 2006; Staiger, H. et al. 2007). Durch Proteinconvertasen kommt es zur Abspaltung des C-Peptids. Daraufhin verkürzt die Carboxypeptidase E das abgespaltene C-Peptid sowie die B-Kette am C-Terminus um zwei basische Aminosäuren. Das gebildete Insulinmolekül wird anschließend als Zink-Insulin Komplex gemeinsam mit dem abgespalteten C-Peptid in den Vesikeln des Golgi-Apparates gespeichert (Staiger, H. & Schleicher, E. 2011).



**Abb. 2: Das menschliche Präproinsulin**

Die Aminosäuren im Signalpeptid sind in grün markiert, die B-Kette rot, das C-Peptid orange und die A-Kette blau. Die gestrichelten Kreise in weiß markieren die Basis der Reste, die Spaltungsstellen für die Konvertierung von Proinsulin in Insulin darstellen (Støy, J. et al. 2007).

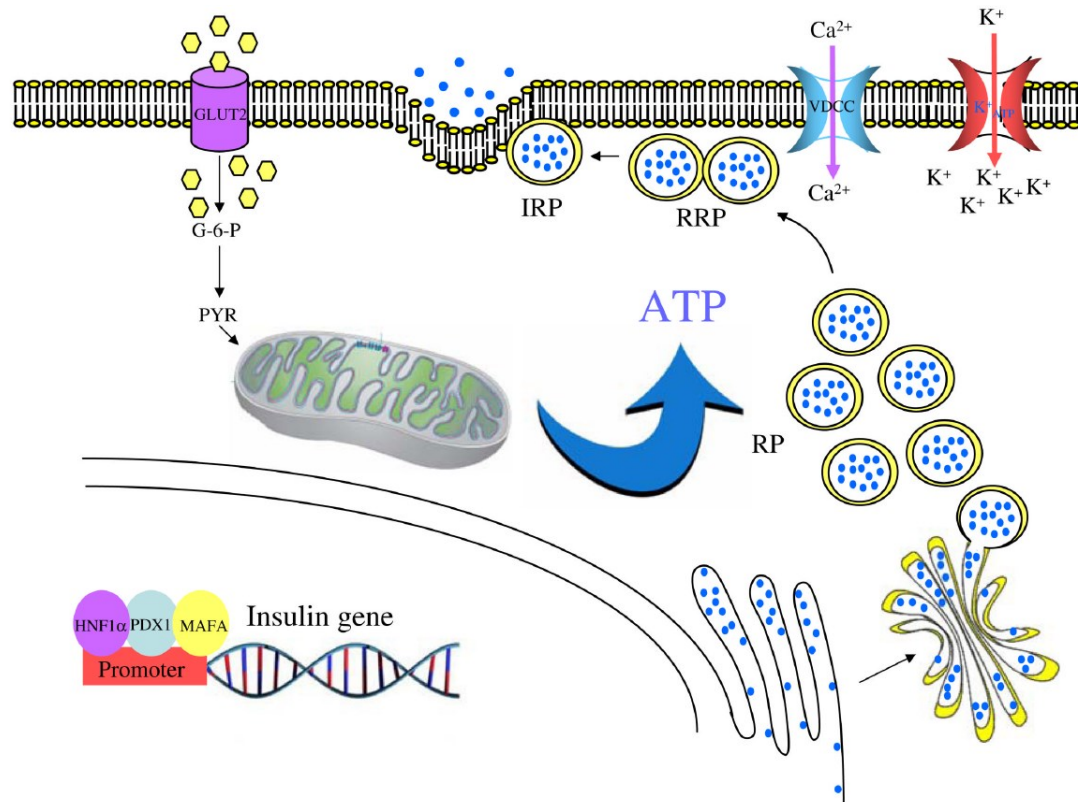
### 1.2.2 Insulinsekretion

Bei Stimulation der  $\beta$ -Zellen wird das in den Vesikeln gespeicherte Insulin in den Blutkreislauf freigesetzt. Die stärkste Stimulation stellt eine erhöhte Blutglukosekonzentration dar (Ashcroft, S.J.H. et al. 1972). Weiterhin wirken eine erhöhte Fettsäurekonzentration, Inkretine und bestimmte Aminosäuren wie Arginin insulinotroph, während Katecholamine wie Noradrenalin Negativmodulatoren darstellen (Prentki, M. et al. 2013; Staiger, H. & Schleicher, E. 2011). Intrazellulär sind vor allem  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP, cAMP und Phospholipid-abgeleitete Signale wie Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-triphosphat die Hauptsignale der Insulinsekretion (Seino, S. et al. 2011).

Im Folgenden wird nur auf den Stimulationsmechanismus über die erhöhte Blutglukosekonzentration eingegangen. Über die Glukosetransporter GLUT1 und 2 gelangt die Glukose aus dem Blut in die  $\beta$ -Zellen. Durch das Glukosesensorenenzym Glukokinase erfolgt die Kopplung an den intrazellulären Stoffwechsel (Baltrusch, S. & Tiedge, M. 2006; Seino, S. et al. 2011). Dabei entstehen unter anderem  $\text{FADH}_2$  und  $\text{NADH}$  die ihre Elektronen an die Atmungskette abgeben, wodurch es zu einem Anstieg der ATP:ADP-Ratio im Zytoplasma kommt (Jitrapakdee, S. et al. 2010). Dies führt zu einer Schließung eines ATP-sensitiven  $\text{K}^+$ -Ionenkanals in der Zellmembran durch allosterische Bindung von ATP an einen daran gekoppelten Sulfonylharnstoffrezeptor (Staiger, H. & Schleicher,

## 1 Einleitung

E. 2011). Es kommt zur Depolarisation der Zelle, wodurch die Öffnung eines spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanals begünstigt wird. Der daraus resultierende Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration stellt einen Stimulus zur Exozytose der mit Insulin beladenen Vesikel dar (Abb. 3) (Jitrapakdee, S. et al. 2010).



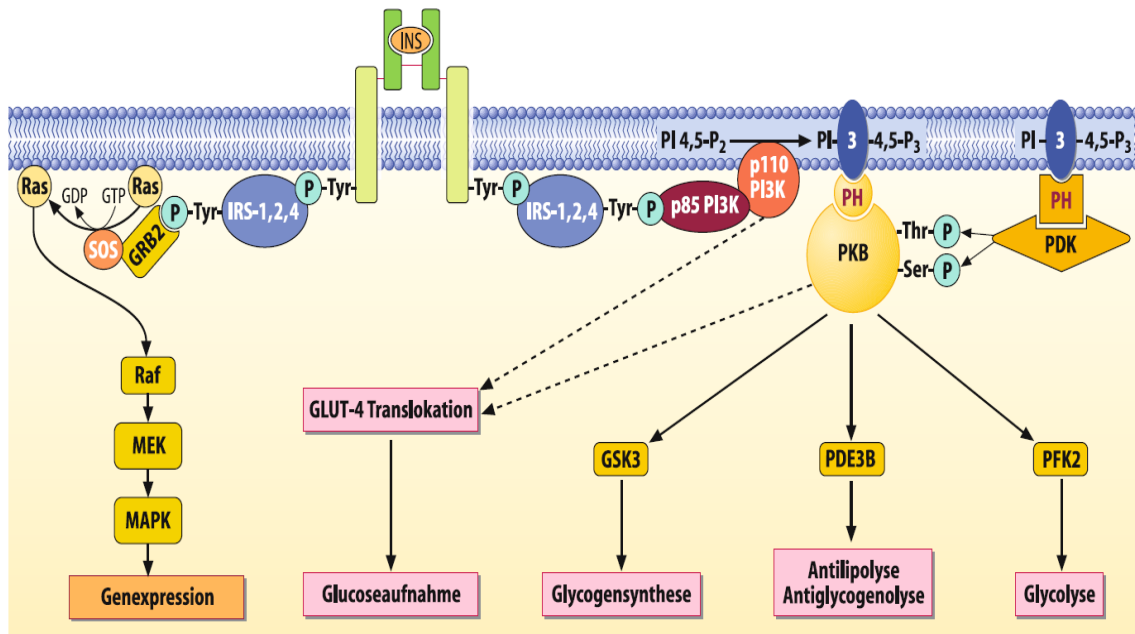
**Abb. 3: Insulinsekretion**

Die Transkription des Insulingens wird über drei Transkriptionsfaktoren reguliert, die spezifisch für die  $\beta$ -Zellen sind: HNF1 $\alpha$ , PDX1 und MafA. Ein erhöhtes Level an extrazellulärer Glukose wird über GLUT2 aufgenommen und durch die Glukokinase schnell zu Glukose-6-phosphat (G-6-P) phosphoryliert. Pyruvat (PR), das terminale Produkt der Glykolyse, wird in den Mitochondrien oxidiert, was zu einer großen Menge an ATP führt. Durch den Anstieg der zellulären ATP:ADP-Ratio kommt es zu einem Schluss  $\text{K}^+$  ATP-sensitiver Kanäle, was eine Depolarisation der Zelle, gefolgt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanäle, zur Folge hat. Dies fördert die Exozytose von Insulingranula. IRP: sofort freisetzbarer Pool; RP: Reserve-Pool; RRP: für die Freisetzung bereitstehender Pool; VDCC: spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanal (Jitrapakdee, S. et al. 2010).

### 1.2.3 Insulinwirkung

Insulinrezeptoren werden in fast allen Zellen des menschlichen Körpers, allerdings mit unterschiedlicher Quantität, exprimiert. Insulinsensitive Organe sind Leber, Muskulatur und Fettgewebe (Staiger, H. & Schleicher, E. 2011). Strukturell zählt der Insulinrezeptor zu den heterodimeren Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität und setzt sich aus zwei extrazellulär gelegenen  $\alpha$ -Untereinheiten sowie zwei durch die Membran verlaufende

$\beta$ -Untereinheiten zusammen (Lin, Y. & Sun, Z. 2010). Eine kovalente Vernetzung der beiden Untereinheiten erfolgt über Disulfidbrücken (Staiger, H. & Schleicher, E. 2011). Insgesamt existieren zwei Isoformen (A und B) des Rezeptors, deren genetische Information mit 22 Exons auf dem kurzen Arm von Chromosom 19 (Bande p13.2-p13.3) codiert ist (Lin, Y. & Sun, Z. 2010; Yang, T.L. et al. 1985). Isoform A dominiert pränatal und zeigt eine hohe Affinität für den Insulinähnlichen-Wachstumsfaktor II (IGF II = Insulin-like growth factor II). In ausdifferenzierten Zellen überwiegt hingegen Isoform B, die eine hohe Affinität zu Insulin aufweist und für die meisten metabolischen Effekte des Hormons verantwortlich ist (Heni, M. et al. 2012). Bindet ein Insulinmolekül die beiden extrazellulär gelegenen  $\alpha$ -Untereinheiten, kommt es durch Konformationsänderung des Rezeptormoleküls zu einer Annäherung der  $\beta$ -Untereinheiten. Dadurch wird die Tyrosinkinase Aktivität der  $\beta$ -Untereinheit aktiviert, was zu einer Autophosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der  $\beta$ -Untereinheit führt (Draznin, B. 2006). Es folgt die Phosphorylierung des Insulinrezeptor-Substrats (IRS) und weiterer Adapterproteine, wodurch es zur Ausbildung von SH2 (src-homologe 2)-Domänen kommt. Diese bilden Andockstellen für Signalproteine, wie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), über die die biologische Wirkung von Insulin vermittelt werden kann (Abb. 4) (Galic, S. et al. 2003). Die hierbei aktivierte PI3K phosphoryliert das in der Zellmembran gebundene Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> kann an Pleckstrin homologe Domänen (PDH) von Proteinen (wie sie z.B. bei der Phosphoinositid-abhängigen Kinase 1 (PDK1) zu finden sind) andocken und diese aktivieren, wodurch weitere Signalwege getriggert werden können (Carnero, A. & Paramio, J.M. 2014).



**Abb. 4: Intrazelluläre Signalübertragung des Insulins**

Nach Phosphorylierung von IRS-Proteinen durch den Insulinrezeptor bestehen zwei Möglichkeiten: Bindung und Aktivierung der PI3-Kinase führt zu metabolischen Insulineffekten (rechts), alternativ kommt es durch Bindung von GRB2 und die anschließende Aktivierung der MAP-Kinasekaskade zu Änderung der Genexpression (links) (Staiger, H. et al., Kapitel 26, 2007)

Als wichtigstes anaboles Hormon des menschlichen Körpers fördert Insulin so die Glykolyse, die Lipogenese wie auch die Proteinbiosynthese und nimmt bei der Differenzierung und Proliferation von Zellen und Geweben eine wichtige Rolle ein (Staiger, H. & Schleicher, E. 2011). Eine Übersicht der peripheren Insulinwirkung ist in Tabelle 2 aufgeführt.

|                      | Leber | Muskel | Fett | Wirkmechanismus  |
|----------------------|-------|--------|------|--|
| Glukosetransport     |       | ↑      | ↑    | GLUT-4 Translokation   |
| Glykolyse            | ↑     |        | ↑    | cAMP↓, Fructose-2,6-biphosphat ↑, Induktion der Schlüsselenzyme der Glykolyse                |
| Glukoneogenese       | ↓     |        |      | cAMP↓, Fructose-2,6-biphosphat ↑, Repression der Schlüsselenzyme der Glukoneogenese          |
| Glykogensynthese     | ↑     | ↑      |      | cAMP↓, Aktivierung der Glykogensynthese  |
| Glykogenolyse        | ↓     |        |      | cAMP↓, Hemmung der Glykogenphosphorylase   |
| Fettsäurebiosynthese | ↑     |        | ↑    | Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase, Induktion der Schlüsselenzyme der Fettsäurebiosynthese |
| Lipogenese           | ↑     |        | ↑    | cAMP↓, Aktivierung und Induktion der Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase                     |
| Lipolyse             |       |        | ↓    | cAMP↓, Hemmung der hormonsensitiven Lipase   |
| Aminosäuretransport  |       | ↑      |      | Induktion der Aminosäuretransporter  |
| Proteinbiosynthese   |       | ↑      |      | mTOR-Aktivierung   |

**Tabelle 2: Übersicht der Insulinwirkungen in Leber, Muskel und Fettgewebe** (Staiger, H. & Schleicher, E. 2011).

### 1.3 Mitochondrien

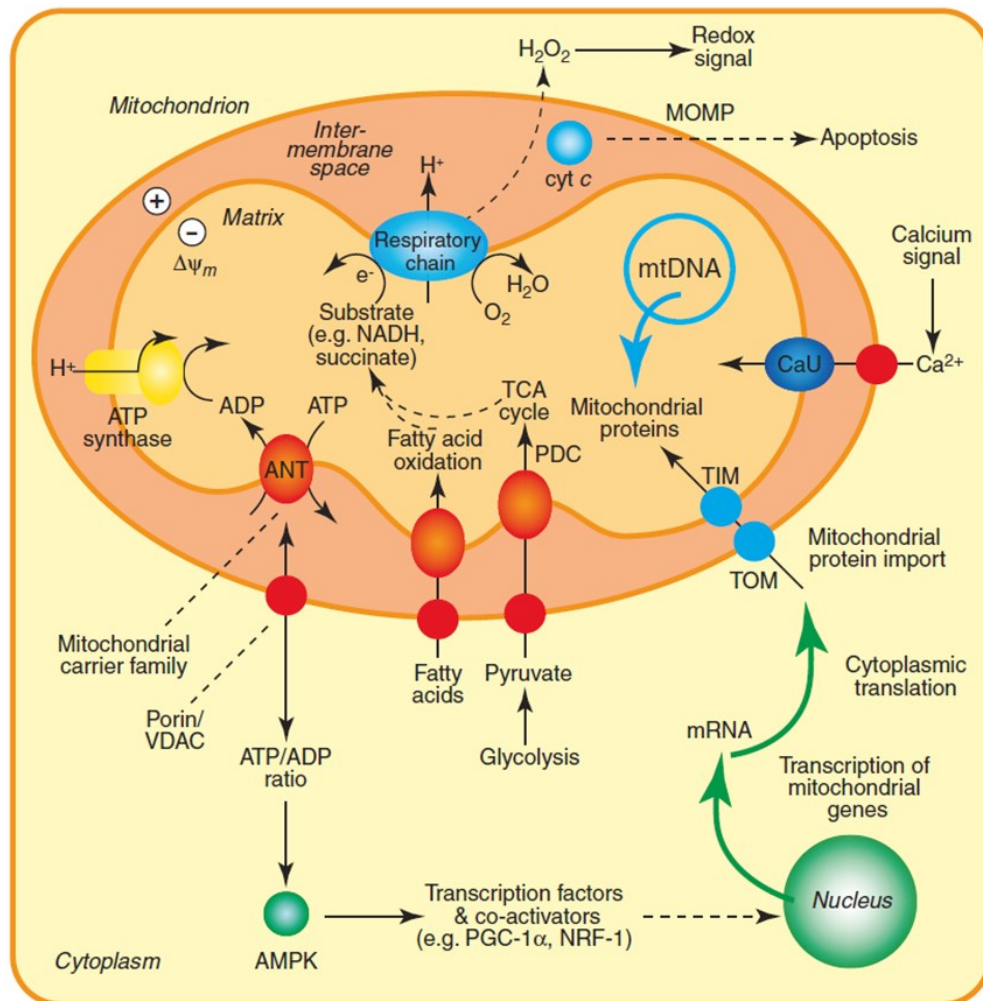


Sowohl für die glukoseinduzierte Insulinsekretion in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen, als auch für die Insulinwirkung, ist der mitochondriale Stoffwechsel essentiell.

Mitochondrien sind Zellorganellen die ursprünglich von freilebenden, aeroben Bakterien abstammen und im Laufe ihrer Entwicklung eine Symbiose mit eukaryotischen Vorläuferzellen eingegangen sind (Zhang, L. et al. 2011). Sie liegen in den unterschiedlichen Zelltypen in variabler Anzahl vor. Beispielsweise sind in Erythrozyten keine Mitochondrien zu finden, während Leberzellen 1000-2000 aufweisen können. Allgemein kann man sagen, dass Zellen, die einen hohen Energieverbrauch haben, einen hohen Anteil an Mitochondrien besitzen (Hirsch-Kaufmann, M. & Schweiger, M. 2006). Dies liegt vor allem daran, dass Mitochondrien Produktionsort des für den Energiehaushalt der Zelle benötigten ATPs sind. Gleichzeitig wird dabei jedoch auch ein großer Teil der zellschädigenden ROS gebildet. Neben der Biosynthese von Metaboliten und Neurotransmittern, spielen Mitochondrien zudem in der Calcium-Homöostase und bei der Kontrolle des Zelltodes eine wichtige Rolle (Waldbaum, S. & Patel, M. 2010).

### **1.3.1 Mitochondrienaufbau**

Es existieren verschiedene Mitochondrienformen (von eiförmig- und stabförmig bis zu komplexen Netzwerken). Diese können jedoch gemäß den Ansprüchen der Zellstruktur und -funktion schnell geändert werden (Hayashi, Y. & Ueda, K. 1989; Hemachandra Reddy, P. et al. 2012). Die mitochondriale Struktur an sich wird durch die Balance von Fusionsprozessen (Austausch mitochondrialer Matrix zwischen den Organellen) und Teilungsprozessen (vermutlich Initial zur Aufrechterhaltung der Funktionalität des mitochondrialen Retikulums) aufrechterhalten (Hebert, S.L. et al. 2010). Den einzelnen Formen gemein ist ihr struktureller Aufbau. Die 1-5  $\mu\text{m}$  langen Organellen besitzen eine Doppelmembran durch die das Mitochondrium in drei Kompartimente unterteilt wird: den intermembranösen Raum zwischen äußerer Membran und gegenüberliegender innerer Membran, die von der inneren Membran gebildeten Cristae und die Matrix (Abb. 5) (Hirsch-Kaufmann, M. & Schweiger, M. 2006; Green, D.E. et al. 1970).



**Abb. 5: Aufbau eines Mitochondrions mit Darstellung wichtiger Funktionen**

Das im Zytosol durch den Abbau von Glukose gebildete Pyruvat wird durch die mitochondriale Membran in das Mitochondrium transportiert und dort im Tricarbonsäurezyklus (TCA) weiter verarbeitet. Die dabei gebildeten Substrate werden in die Atmungskette eingeschleust. Diese ist für die Hauptaufgabe der Mitochondrien, die Produktion von ATP durch die oxidative Phosphorylierung, verantwortlich. Weiterhin befinden sich im Zytosol spannungsabhängige Anionen Kanäle (VDACs = voltage dependent anion channels) über die kleine Moleküle die äußere Membran passieren können. Die Aktivierung einer Adenosinmonophosphat abhängigen Kinase (AMPK) erlaubt der Zelle auf eine niedrige zytosolische ATP:ADP-Ratio zu antworten. Zusätzlich können nukleär codierte Proteine durch TIM (Transporter der inneren Membran = transporter inner membrane) und TOM (Transporter der äußeren Membran = transporter outer membrane) in das Mitochondrium importiert werden. Die Adenin Nukleotid Translokase (ANT) ermöglicht den Mitochondrien den Import von ADP und den Export von ATP. Weitere Abkürzungen: CaU = Calcium-Uniporter; mtDNA = mitochondriale DNA; MOMP = mitochondriale Durchlässigkeit der äußeren Membran (mitochondrial outer membrane permeabilization); Cyt c = Cytochrome c (Smith, R.A.J. et al. 2012).

Die äußere Membran dient dem Schutz des Mitochondrions (Hirsch-Kaufmann, M. & Schweiger, M. 2006). Moleküle von einer Größe < 5-6 kDa und Ionen können die Membran direkt über darin enthaltene Porine passieren. Größere Proteine müssen für den Transport über die äußere Membran eine spezifische Signalsequenz besitzen (Hirsch-Kaufmann, M. & Schweiger, M. 2006; Waldbaum, S. & Patel, M. 2010). Die Oberfläche

## 1 Einleitung

der inneren Membran ist im Gegensatz zu der äußeren durch ihre starke Faltung vergrößert und in ihrer Permeabilität durch Cardiolipin weiter eingeschränkt. Permeasen innerhalb der Membran ermöglichen unter ATP-Verbrauch beispielsweise den Durchtritt von Aminosäuren oder Glukose (Hirsch-Kaufmann, M. & Schweiger, M. 2006). Darüber hinaus schaffen dynamische Multiproteinkomplexe, die sogenannten Permeabilitäts-Transmissions-Poren (PTP), eine Verbindung zwischen der inneren und der äußeren Membran. Sie fungieren als Calcium-, Spannungs-, pH-, und Redoxgesteuerte-Kanäle (Zamzami, N. et al. 2007). Die innere Membran ist zudem Sitz der für den Organismus essentiellen Atmungskette. An der dem Matrixraum zugewandten Seite ist die ATP-Synthase (auch als Komplex V der Atmungskette bezeichnet) lokalisiert. In der Matrix selbst befinden sich verschiedenste substratabbauende Enzyme wie z.B. solche für den Zitronensäurezyklus. Im mitochondrialen Innenraum kann Calcium durch Präzipitation gespeichert werden (Hirsch-Kaufmann, M. & Schweiger, M. 2006).

### 1.4 Mitochondriale Atmungskette

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus fünf Proteinkomplexen, die in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert sind (Abb. 6). Die Atmungskette ist von besonderer Bedeutung im Energiestoffwechsel der Zellen, da durch sie ein für die ATP-Bildung wichtiger elektrochemischer Gradient aufgebaut wird (Brandt, U. 2007).

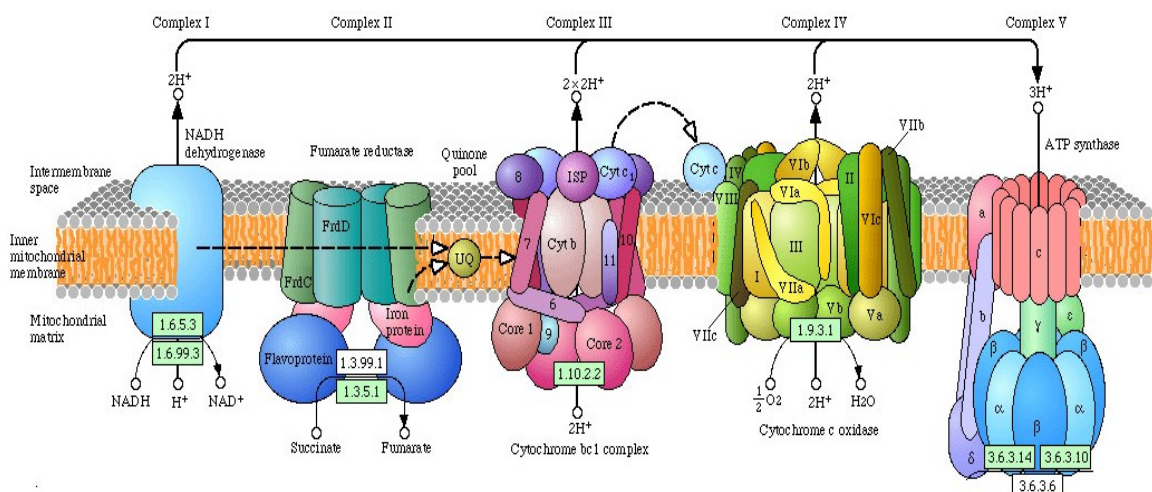


Abb. 6: Enzymkomplexe der Atmungskette in der inneren Mitochondrien-Membran (Brockington, A. et al. 2010)

### **1.4.1 Komplex I**

Den ersten und gleichzeitig größten Komplex der Atmungskette bildet die NADH-Dehydrogenase. Sie ist aus 45 Untereinheiten aufgebaut, von denen 7 auf dem mitochondrialen Genom und der Rest auf der nukleären DNA codiert werden (Koene, S. et al. 2012). Die Funktion des Komplex I besteht darin, den Elektronentransfer von NADH, dass unter anderem im Zitratzyklus gebildet wird, über das nicht kovalent gebundene Flavinmononuklotid (FMN) und die 8 Eisen-Schwefel-Zentren zu Coenzym Q zu transferieren (Rassow, J. 2006; Diaz, F. et al. 2011). Hierbei sind die Oxidation von NADH und der Transfer von zwei Elektronen energetisch an die Translokation von vier Protonen gekoppelt (Vinogradov, A.D. 2008). Für diese Vorgänge sind drei Module in Komplex I verantwortlich: ein N-Modul, dass der NADH-Oxidation dient, ein Q-Modul für die Ubiquinon-Reduktion sowie ein P-Modul für die Protonentranslokation (Koene, S. et al. 2012). Die Module sind in Form eines L's angeordnet, wobei das P-Modul in der inneren Mitochondrienmembran eingebaut ist, während das N- und Q-Modul in die Mitochondrienmatrix hinein ragen (Koene, S. et al. 2012).

### **1.4.2 Komplex II**

Die als enzymatischer Bestandteil im Zitratzyklus vorkommende Succinat-Dehydrogenase bildet den Komplex II der Atmungskette. Sie besteht aus vier Untereinheiten die alle nukleär codiert werden (Diaz, F. et al. 2011). Die beiden kleinsten, aus hydrophoben Proteinen bestehenden Untereinheiten verankern das Enzym in der mitochondrialen Innenmembran (Beattie, D.S. 2002; Diaz, F. et al. 2011). Über die größte Untereinheit erfolgt die Substratbindung (Beattie, D.S. 2002). An ihr ist das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), dass als Cofaktor bei der Katalyse der Oxidation von Succinat zu Fumarat reduziert wird, kovalent über einen Histidinrest gebunden (Diaz, F. et al. 2011; Beattie, D. S. 2002). Von FAD werden die an der Reaktion beteiligten Elektronen über die drei Eisen-Schwefel-Zentren, die Bestandteil der zweiten Untereinheit sind, zu Ubiquinon transferiert (Beattie, D.S. 2002; Diaz, F. et al. 2011). Anders als Komplex I stellt die Succinat-Dehydrogenase jedoch keine Protonenpumpe dar (Rassow, J. 2006). Sie ist, wie auch das elektronentransferierende Flavoprotein (ETF), neben Komplex I, ein Seiteneinstieg in die Atmungskette (Brandt, U. 2007).

### 1.4.3 Komplex III

Komplex III der Atmungskette ist die Cytochrom-c-Reduktase. Es handelt sich um ein dimeres Enzym bestehend aus drei katalytischen und acht strukturellen Untereinheiten (Smith, P.M. et al. 2012; Diaz, F. et al. 2011). Mit Ausnahme von Cytochrom b wird jede dieser Untereinheiten nukleär codiert (Chen, J. et al. 2009). Das Redox-Zentrum setzt sich aus den drei großen Untereinheiten zusammen: Cytochrom c1, das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (RISP) sowie Cytochrom b (Diaz, F. et al. 2011). Cytochrom c1 und RISP sind jeweils über eine einzelne Transmembrandomäne in der inneren Membran verankert. Ihre prosthetischen Gruppen (Häm c und  $\text{Fe}_2\text{S}_2$ -Zentrum) ragen in den Intermembranraum hinein (Smith, P.M. et al. 2012). Komplex III besitzt insgesamt zwei Bindungsstellen für Ubiquinol/Ubiquinon ( $\text{QH}_2/\text{Q}$ ), wobei die Oxidation von Ubiquinol nahe dem Intermembranraum stattfindet, während die Reduktion des Ubiquinons (Q) an der Matrix zugewandten Seite abläuft (Chen, J. et al. 2009). Ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ), dass zuvor durch die Aufnahme zweier Elektronen von Komplex I oder II aus Ubiquinon entstanden ist, gibt dabei seine Elektronen an Komplex III ab. Das erste Elektron gelangt zum RISP, von dem es über Cytochrom c1 auf das mobile, an der mitochondrialen Membran lokalisierte Cytochrom c weitergeleitet wird (Chen, J. et al. 2009; Chandel, N.S. 2010). Dieses transportiert das aufgenommene Elektron zum Komplex IV der Atmungskette (Chen, J. et al. 2009). Aus Ubiquinol wird dabei das chemisch instabile Ubisemiquinon-Radikal gebildet, welches sein unpaares Elektron an die Häm bL Gruppe von Cytochrom b abgibt. Von dort wird das Elektron auf die zweite Häm Gruppe von Cytochrom b, das Häm bH, weitergeleitet. Am Häm bH kommt es daraufhin zu einer Reduktion eines weiteren Ubiquinon-Moleküls und zu einer erneuten Ubisemiquinon-Bildung (Chandel, N.S. 2010). Dieser Vorgang wird unter dem Begriff Q-Zyklus zusammengefasst. An der Redoxreaktion von  $\text{Q}/\text{QH}_2$  ist auch ein Transfer von Protonen involviert. Durch diesen Prozess kommt es zu einer Abgabe von vier Protonen in den Intermembranraum und zu einer Aufnahme von zwei Protonen aus der Zellmatrix (Chen, J. et al. 2009). Alles in allem werden im Laufe zweier Q-Zyklen zwei Ubiquinol-Moleküle oxidiert und ein Ubiquinol-Molekül sowie zwei Moleküle Cytochrom c reduziert (Chandel, N.S. 2010).

### **1.4.4 Komplex IV**

Die Cytochrom-c-Oxidase bildet den IV. Komplex der mitochondrialen Atmungskette (Fontanesi, F. et al. 2008). Im menschlichen Organismus setzt er sich aus zwei Monomeren mit 13 verschiedenen Untereinheiten zusammen (Abb. 7) (Tsukihara, T. et al. 1996). Drei dieser Untereinheiten (Cox1, Cox2, Cox3), die stark hydrophobe Transmembranproteine darstellen, werden mitochondrial codiert, während die restlichen 10 Untereinheiten im Zellkern codiert und anschließend vom Zytosol ins Mitochondrium transportiert werden (Fontanesi, F. et al. 2008; Mick, D. U. et al. 2011). Einzig die Untereinheiten Cox1 und Cox2 enthalten die für die Funktion des Enzyms als redoxgekoppelte Protonenpumpe wichtigen Redoxfaktoren. Im Kernprotein Cox1, bestehend aus 12 transmembranen Helixes, sind zwei Häm-Moleküle sowie ein Kupfer-Ion an der CuB Seite gebunden (Tsukihara, T. et al. 1996; Mick, D. U. et al. 2011). Innerhalb der Cox2 Untereinheit sind zwei Kupfer-Ionen an der CuA Seite gebunden. In deren Nähe, auf Seiten des Intermembranraums, beinhaltet Cox2 zudem eine Bindungsstelle für Cytochrom c (Mick, D. U. et al. 2011; Müller-Esterl, W. et al. 41.6, 2011). Die dritte mitochondrial codierte Untereinheit Cox3, ein integrales Membranprotein aus 7 Helixes, besitzt hingegen keine Redoxfaktoren (Fontanesi, F. et al. 2006). Über die Helix I bzw. III tritt Cox3 jedoch in Interaktion mit den Helixes III und IV bzw. IV und V von Cox1 (Tsukihara, T. et al. 1996). Wie genau die Bildung der einzelnen Untereinheiten gesteuert wird und welche Mechanismen in der Interaktion und Komplexbildung zwischen den einzelnen Untereinheiten eine Rolle spielen, ist jedoch noch unklar (Mick, U.D. et al. 2011). Man vermutet, dass ein multiples Protein-Protein Interaktionsnetzwerk der Zelle an diesen Prozessen beteiligt ist (Fontanesi, F. et al. 2006). Weiterhin geht man auch von einer Regulation auf Ebene der Translation bzw. Transkription aus, darunter beispielsweise die Bereitstellung von Untereinheiten wie auch Faktoren die an deren Zusammenlagerung involviert sind (Fontanesi, F. et al. 2006). Veränderungen im Prozess der Komplexbildung können zu einer ineffizienten Funktion der Cytochrom-c-Oxidase führen, was mit einer gesteigerten ROS Produktion einher geht (Fontanesi, F. et al. 2006).

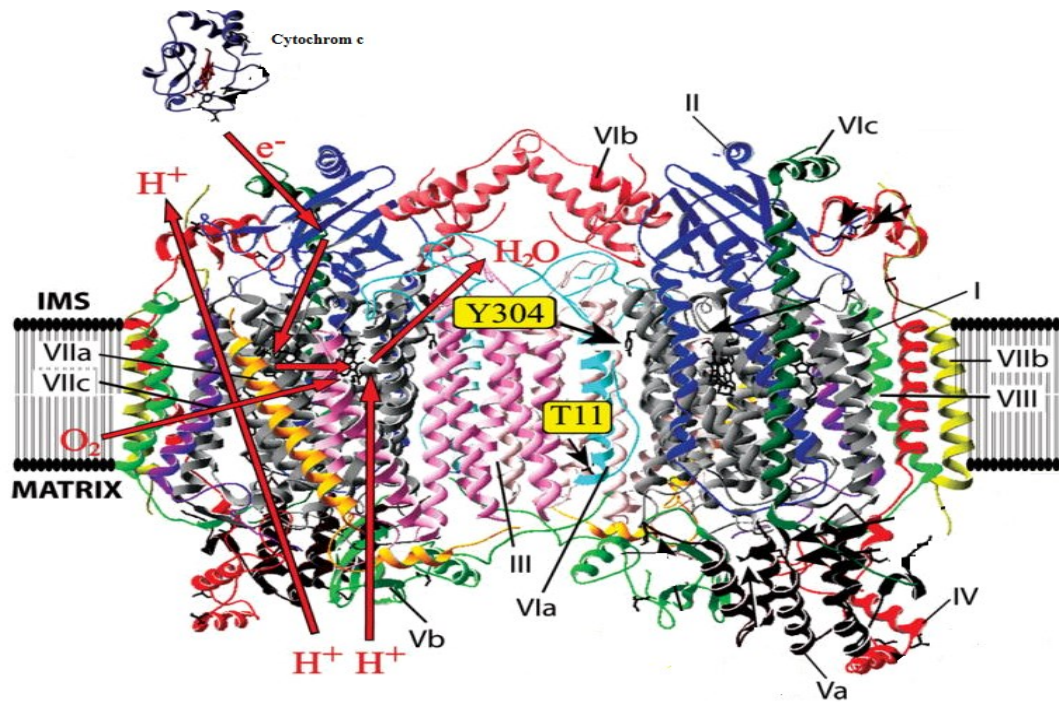


Abb. 7: Kristallstruktur von Pferdeherz Cytochrom c und Kuherz Cytochrom-c-Oxidase. Die Untereinheit Cox3 der Cytochrom-c-Oxidase ist in pink dargestellt (Hüttemann, M. et al. 2012).

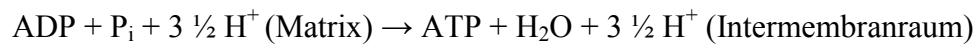
Die Funktion der Cytochrom-c-Oxidase besteht in der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser und dem damit verbundenen Protonentransfer, der zu einer weiteren Verstärkung des elektrochemischen Protonengradienten führt (Kim, Y. C. & Hummer, G. 2012). Für diesen Vorgang werden vier vom Cytochrom c aufgenommene Elektronen vom CuA Zentrum in Cox2 über das Häm a auf die P Seite (Intermembranraum) der Membran gebracht und zum binukleären Zentrum von Cox1, welches die Redoxfaktoren Häm a3 und CuB enthält, weiter transferiert. Im binukleären Zentrum, mit Häm a3 und CuB als Redoxfaktoren, erfolgt nun die Bindung und anschließende Reduktion von Sauerstoff zu Wasser (Kim, Y.C. & Hummer, G. 2012). Insgesamt werden für die Bildung von molekularem Sauerstoff vier Elektronen von vier Molekülen Cytochrom c benötigt. Der molekulare Sauerstoff wird dabei, unter Aufnahme von zwei aus der Matrix stammenden Protonen, zu Wasser reduziert. Gleichzeitig werden vier weitere aus der Matrix stammende Protonen über einen noch ungeklärten Mechanismus in den Intermembranraum transloziert (Müller-Esterl, W. et al. 2011).

### 1.4.5 Komplex V

Die auch als Komplex V bezeichnete ATP-Synthase ist eine kationentranslozierende ATPase, die unter der treibenden Kraft eines transmembranalen Protonengradienten die



Bildung von ATP katalysiert (Dargel, R. 1981). Dabei läuft folgende reversible Reaktion ab (Brandt, U. 2007):



Die ATPase setzt sich aus einem membrangebundenen, hydrophoben  $F_0$ -Anteil (O = Oligomycin) und einem hydrophilen, in die Matrix ragenden  $F_1$ -Anteil zusammen (Voet, D. & Voet, J. G. 1995). Der  $F_1$ -Teil besteht aus jeweils drei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, die einen kompakten Ring ausbilden. In der Mitte dieser Ringstruktur befindet sich die  $\gamma$ -Untereinheit. Je eine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bilden ein katalytisches Zentrum, an dem die spätere ATP-Bildung erfolgt. Der  $F_0$ -Teil besteht zum größten Teil aus dem Rotator, der mit seinen ca. 12 c Untereinheiten in der mitochondrialen Innenmembran verankert ist. Seitlich davon liegt die  $\alpha$ -Untereinheit und in der Mitte ist die  $\gamma$ -Untereinheit verankert (Rassow, J. 2006). In ihr sind spezifische Poren enthalten, die den über die Komplexe I, III und IV aus der Matrix translozierten Protonen die Passage über die Membran ermöglichen (Mathews, C.K. & van Holde, K.E. 1990). Durch den Einstrom der Protonen in die mitochondriale Matrix über den  $F_0$ -Teil kommt es zu einer Drehung des Rotors, die sich auf die im Rotor verankerte  $\gamma$ -Untereinheit überträgt. Dies hat eine Konformationsänderung in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des  $F_1$ -Teils zur Folge, welche zur Bildung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat kommt (Rassow, J. 2006). Die treibende Kraft für diese Reaktion stellt der durch die Elektronentransportkette generierte elektrochemische Gradient dar. Dabei beträgt die freie Energie des Protonentransports etwa 19 kJ/mol. Für die Bildung eines einzelnen ATP-Moleküls werden mindestens 50 kJ/mol gebraucht, sodass insgesamt drei Protonen für die Bildung von einem ATP-Molekül nötig sind (Cypionika, H. 1999).

### **1.5 Reaktive Sauerstoffspezies**

Man vermutet, dass 2-3 % aus den Mitochondrien verbrauchten  $\text{O}_2$  unvollständig reduziert werden und zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt (Hamanaka, R.B. & Chandel, N.S. 2009). Die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zählen zu den aus Sauerstoff generierten Radikalen (Li, S. et al. 2012). Aufgrund ihrer chemischen Instabilität gehen sie leicht Redoxreaktionen mit anderen Molekülen wie Proteinen, Lipiden oder DNA ein (Gomes, E.C. et al. 2012). Die wichtigsten im

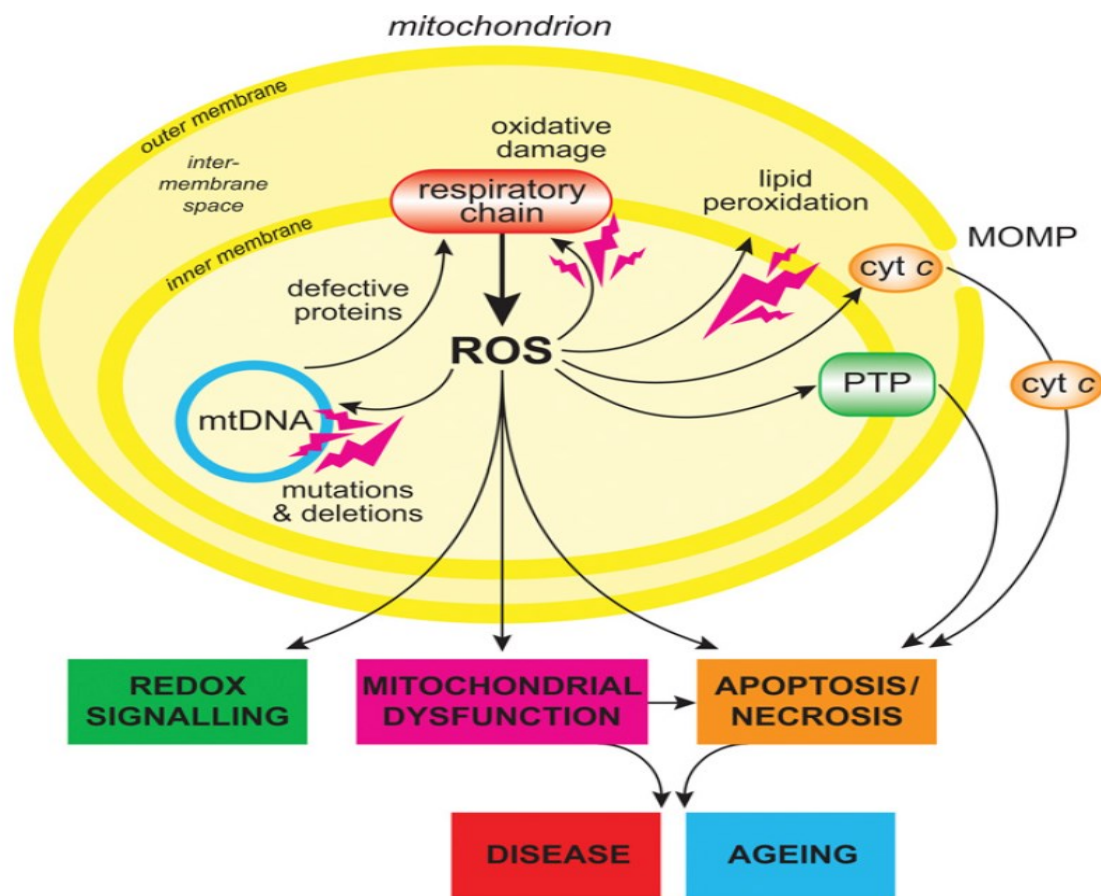


Organismus vorkommenden ROS Spezies sind: Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\bullet$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Peroxynitrite ( $\text{OONO}^-$ ) (Brennan, L.A. et al. 2009).

Bei der Entstehung von ROS im Organismus sind sowohl exogene wie auch endogene Faktoren beteiligt. Als exogene Faktoren können unter anderem UV-Licht, ionisierende Strahlung, Umweltgifte und Chemotherapeutika die Bildung von ROS fördern (Brennan, L.A. et al. 2009). Man geht jedoch davon aus, dass die endogene Produktion von ROS durch Peroxisomen, die Lipooxygenase, die NADPH-Oxidase und die mitochondriale Atmungskette sowie Cyclooxygenase (COX) den wesentlich bedeutenderen Faktor einnimmt (Brennan, L.A. et al. 2009; Mari, M. et al. 2010). Unter physiologischen Bedingungen ist die mitochondriale Atmungskette ein Hauptort der ROS Generierung (Pi, J. et al. 2010). Innerhalb der Atmungskette kommt es vor allem an den Komplexen I, II und III zu einer Produktion von ROS. Dabei steht die Bildung von Ubisemichinon im Vordergrund. Im Gegensatz zu Komplex I und II, bei denen die ROS Bildung nur auf einer Seite der mitochondrialen Matrix erfolgt, ist Komplex III in der Lage an beiden Seiten der inneren mitochondrialen Membran ROS zu generieren (Hamanaka, R.B. & Chandel, N.S. 2009). Die dabei gebildeten Superoxidmediate können unter anderem über Superoxid-Dismutasen (SOD) in das chemisch stabilere Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) umgewandelt werden, welches in der Lage ist, durch die Zellmembran zu diffundieren.

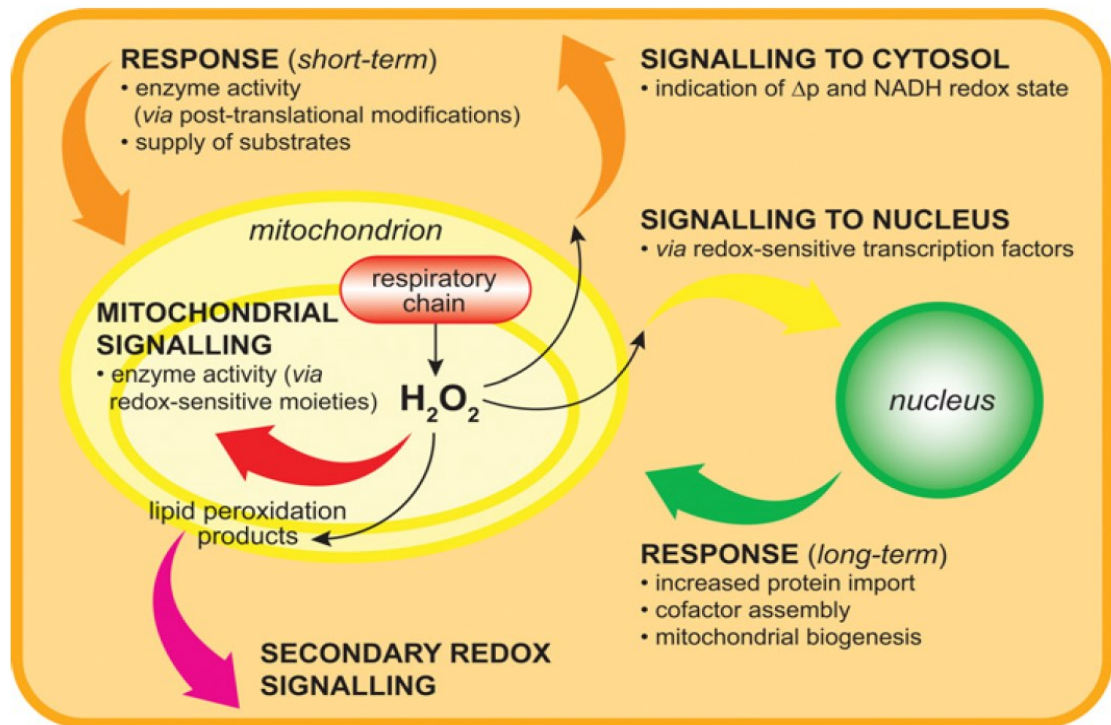
In geringem Maße werden  $\text{H}_2\text{O}_2$  und weitere ROS auch als physiologischer Bestandteil im zellulären Metabolismus gebildet. Dabei spielen sie eine Rolle in der Regulation von Signalkaskaden, sowie von Proliferations- und Differenzierungsvorgängen der Zelle. Dies erfolgt z.B. über Oxidation redoxsensitiver Proteine wie der Tyrosin-Phosphatase.  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann zudem über die Katalase, die Glutathion-Peroxidase und über Thioredoxine zu Wasser reduziert werden (Wellen, K.E. & Thompson, C.B. 2010). Allerdings können Änderungen im oxidativem Stoffwechsel der Mitochondrien zu einem Anstieg der ROS Produktion über einen Schwellenwert führen, was Zellschäden bis hin zum Zelltod verursachen kann. Hierbei kann  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Anwesenheit von Übergangsmetallen über die Fenton-Reaktion in ein hoch reaktives Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) reduziert werden. Mögliche Folge ist eine Schädigung von Makromolekülen einschließlich DNA, Membranlipiden und Proteinen (Wellen, K.E. & Thompson, C.B. 2010). Des Weiteren konnte eine Beteiligung von ROS in einer Vielzahl von Erkrankungen darunter Krebs, Diabetes mellitus Typ II, Arteriosklerose, inflammatorische Störungen, Ischämie- und Reperfusionsschäden gezeigt werden (Brennan, L.A. et al. 2009). Im Alter wurde ein Anstieg an ROS

durch Abnahme zellulärer antioxidativer Kapazität nachgewiesen, sodass man davon ausgeht, dass ROS im Alterungsprozess und damit assoziierten Schäden involviert ist. Vermutet wird, dass es hierbei zu einer ROS induzierten Akkumulation mutierter mtDNA kommt die in einer mitochondrialen Dysfunktion mündet (Abb. 8.1 & 8.2) (Brennan, L.A. et al. 2009). Um der Schädigung durch ROS entgegen zu wirken, sind die Zellen auf antioxidative Mechanismen angewiesen, wie beispielsweise die Superoxid-Dismutasen und die Katalase, die im kommenden Abschnitt genauer erläutert werden.



**Abb. 8.1: Überblick der mitochondrialen ROS Produktion**

ROS Produktion über Mitochondrien kann zu oxidativem Schaden mitochondrialer Proteine, Membranen und DNA führen und dadurch auch die Fähigkeit der Mitochondrien ATP zu synthetisieren sowie weitere mitochondriale Funktionen (wie die Fettsäuresynthese und den Aminosäurezyklus) beeinflussen. Mitochondrialer oxidativer Schaden kann auch die Tendenz der Mitochondrien steigern Intermembranproteine wie Cytochrom c (cyt c) über die mitochondriale Membran zum Zytosol zu transportieren und dabei die zelluläre Apoptosemaschine zu aktivieren. Darüber hinaus führt die mitochondriale ROS Produktion zu einer Induktion mitochondrialer Permeabilitäts-Transmissions-Poren (PTP), welche unter ischämischen Bedingungen die innere Membran durchlässig machen für kleine Moleküle. Des Weiteren scheinen mitochondriale ROS als ein modulierbares Redox-Signal zu fungieren, dass reversiblen Einfluss auf die Funktionen von Mitochondrien, Zytosol und Nukleus hat. Weitere Abkürzungen: MOMP = mitochondriale Durchlässigkeit der äußeren Membran (mitochondrial outer membrane permeabilization) (Murphy, M.P. 2009).



**Abb. 8.2: Mögliche Mechanismen des mitochondrialen Redox-Signalwegs**

Die mitochondriale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion stellt ein potentielles Redoxsignal dar. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann die Aktivität von Proteinen reversibel beeinflussen. Diese Modifikationen können in Mitochondrien, im Zytosol oder an nukleären Enzymen, Carriers oder Transkriptionsfaktoren stattfinden und vorübergehend deren Aktivität beeinflussen. Das Ausmaß der mitochondrialen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion ist abhängig von Faktoren wie  $\Delta p$  oder dem Redoxstatus des NADH-Pools. Des Weiteren kann die mitochondriale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion auch als retrogrades Signal für den Rest der Zelle fungieren (Murphy, M.P. 2009).

### 1.5.1 Superoxid-Dismutasen

ROS werden im Organismus vor allem in der mitochondrialen Atmungskette generiert. Dabei kann es durch eine Ein-Elektronen Reduktion von O<sub>2</sub> zu einer Bildung von Superoxid-Radikalen kommen. Superoxid-Radikale an sich können spontan weiter zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> reagieren, jedoch läuft dieser Vorgang bei physiologischen pH-Werten nur sehr langsam ab (Whittaker, J.W. 2010).



(Reaktionsgleichung: Müller-Esterl, W. et al. 2011)

Enzyme, wie die Superoxid-Dismutasen, können diese Reaktion katalysieren und somit den Vorgang beschleunigen, weshalb sie eine wichtige Rolle in der Bekämpfung der überschüssigen ROS einnehmen (Whittaker, J.W. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation der SOD-Gene bedeutend für die Homöostase der ROS Konzentration ist

und sie essentiell für das Überleben in einer aeroben Umwelt sind. Zudem wird diskutiert, in wieweit Superoxid-Dismutasen mit neurodegenerativen Erkrankungen, pulmonalen und kardiovaskulären Dysfunktionen, Krebsentstehung und -progression in Verbindung stehen.

Im menschlichen Organismus sind bisher drei Isoformen der Superoxid-Dismutasen mit ähnlicher Funktion bekannt. Ihre Information wird jedoch auf verschiedenen Genen codiert. Weitere Unterschiede zeigen sich in ihrer Proteinstrukturen, ihrer zellulären Verteilung, sowie ihren metallischen Cofaktoren (Miao, L. & Clair, D.K. St. 2009).

Die SOD1 kommt ubiquitär in humanen Zellen vor. Auf der DNA ist sie in der Region 21q22.1 von Chromosom 21 kodiert. Hauptlokalisationsort ist das Zytoplasma, in dem die SOD1 als 32 kDa großes Homodimer vorliegt. Nur ein geringer Prozentsatz ist im intermembranösen Raum der Mitochondrien zu finden (Fukai, T. & Ushio-Fukai, M. 2011). Mit nur 154 Aminosäuren ist die SOD1 ein kleines Protein, das in acht Strängen als  $\beta$ -Fass gefaltet vorliegt (Kawamata, H. & Manfredi, G. 2010). Im aktiven Zentrum ist ein Kupferatom gebunden, dass für die Funktion als Superoxid-Dismutase von essentieller Bedeutung ist. Als weiteres Metall kommt ein Zinkatom vor, dessen Austausch jedoch nicht zu einem Funktionsverlust des Enzyms führt (Fukai, T. & Ushio-Fukai, M. 2011). In transgenetischen Mäusen konnte festgestellt werden, dass eine SOD1-Überexpression den Cytochrom c-Abbau und den neuronalen Zelltod z.B. nach subarachnoidaler Hämorrhagie, stark inhibiert und in Abhängigkeit von DAF-16 (FoxO) und HSF-1 die Lebensspanne erhöht (Niizuma, K. et al. 2009; Cabreiro, F. et al. 2011). Andere Untersuchungen heben jedoch den Anstieg des Wasserstoffperoxids als zelltoxisches Molekül durch gesteigerte SOD1-Aktivität hervor (Fukai, T. & Ushio-Fukai, M. 2011).

Die Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) bildet im Gegensatz zur SOD1 ein 96 kDa großes Homotetramer, dass in seinem aktiven Zentrum das Übergangsmetall Mangan gebunden hat (Fukai, T. & Ushio-Fukai, M. 2011). Auf der DNA ist es codiert auf dem Chromosom 6q25.3 (Miao, L. & Clair, D.K. St. 2009). Da die Hauptlokalisation der SOD2 die mitochondriale Matrix ist, nimmt sie eine wichtige Rolle in der Umwandlung von in der Atmungskette generierten Superoxid-Anionen ein. SOD2 knockout Mäuse (SOD2  $-/-$ ) zeigten eine Kardiomyopathie und Neurodegeneration, was den frühen postnatalen Tod der Mäuse zu Folge hatte (Fukai, T. & Ushio-Fukai, M. 2011). Inwiefern SOD2 eine Rolle im Alterungsprozess spielt, muss jedoch noch genauer untersucht

werden. Des Weiteren scheint es, auf Basis des Polymorphismus im menschlichen SOD2-Gen, eine Assoziation mit Diabetes mellitus Typ 2 zu geben (Nomiyama, T. et al. 2003).

### **1.5.2 Katalase**

Katalasen sind intrazelluläre Enzyme, welche anhand ihrer Sequenz und Struktur in drei Klassen eingeteilt werden können: 1. monofunktionale Häm-enthaltende Enzyme, 2. bifunktionale Häm-enthaltende Enzyme und 3. manganhaltige Enzyme (Chelikani, P. et al. 2004). Die humane Katalase setzt sich aus vier identischen Untereinheiten von je 60 kDa zusammen, die jeweils eine Häm-Gruppe und eine NADPH-Bindestelle enthalten (Putnam, C.D. et al. 2000). Die Hauptaufgabe der Katalase besteht in der Katalyse der Umwandlung von zellschädigendem  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$ . Eine weitere Funktion des Enzyms besteht darin die Oxidation von Elektronen-Donatoren wie beispielsweise Phenolen zu katalysieren, sofern intrazellulär eine geringe  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration vorliegt (Percy, ME. 1984). In Studien zeigte sich zudem, dass Katalase die Sensitivität der TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose erhöht. Grund hierfür ist eine Veränderung des Redoxstatus innerhalb der Mitochondrien, zu der die Katalase beizutragen scheint (Bai, J. & Cederbaum, Al. 2001). Weiterhin kann erhöhter oxidativer Stress verschiedene Aminosäuren der Katalase modifizieren und zu einer herabgesetzter Aktivität des Enzyms führen. Defizite in der Aktivität von Katalasen stehen im Zusammenhang mit der Entwicklung des T2DM (Banerjee, M. & Vats, P. 2014).

### **1.5.3 Einfluss von ROS auf Insulinsekretion und Insulinwirkung**

In geringen Mengen sind ROS physiologisch und nehmen eine wichtige Rolle in den durch Insulin über NAD(P)H-Oxidase abhängige Mechanismen vermittelten Signalwegen ein. Dabei kommt es durch die Stimulation der Zelle mit Insulin zu einem Anstieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Produktion, über den es zu einer Exposition der Zelle mit ROS kommt. Dies führt über die Inhibierung der Tyrosin-Phosphatase Aktivität zu einer Verbesserung der Insulin Kaskade, sodass das basale Level der Tyrosin-Phosphorylierung am Insulinrezeptor, wie auch an dessen Substraten, erhöht wird (Rains, J.L. & Jain, S.K. 2011). Eine temporäre und kontrollierte ROS Produktion steigert demnach die Insulinsensitivität (Wellen, K.E. & Thompson, C.B. 2010). Chronische Hyperglykämie, wie sie beim Diabetes mellitus auftritt, kann jedoch über unterschiedliche Mechanismen direkt oder indirekt zu einem

unkontrollierten Anstieg der intrazellulären ROS Bildung führen. Ungünstig ist hierbei der Zustand, dass gerade  $\beta$ -Zellen aufgrund eines ohnehin niedrigen Expressionslevels antioxidativer Enzyme wie Katalase und Glutathion-Peroxidase, empfindlich gegenüber ROS Steigerung reagieren (Tiedge, M. et al. 1997; Kaneto, H. et al. 2010).

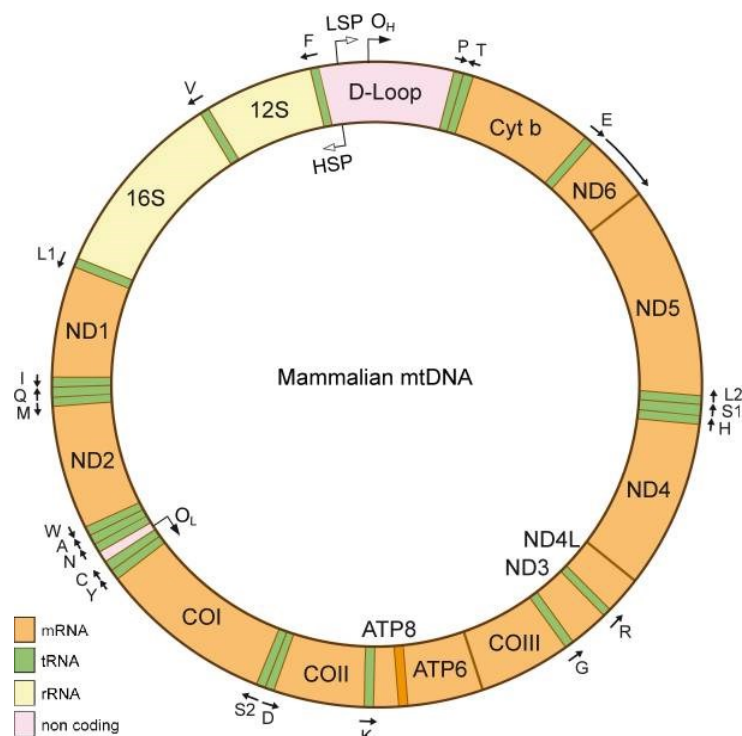
Im Laufe der Hyperglykämie werden vermehrt alternative Glukosestoffwechselwege getriggert durch die es unter anderem zu einem Verbrauch an NADPH kommt, welches einen essentiellen Co-Faktor für die Produktion des antioxidativ wirkenden GSH ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine) darstellt. Auf der anderen Seite führt die Umwandlung von Sorbitol in Fructose über den Polyol-Weg zu einem Anstieg der NADH: NAD<sup>+</sup>-Ratio, deren mögliche Konsequenz eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und eine Inhibition von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist. Somit führen diese alternativen Glukosestoffwechselwege bei Hyperglykämie nicht nur direkt sondern auch indirekt zu einer ROS Steigerung, die zu einem Redoxungleichgewicht der Zellen und damit vermehrter Exposition der selbigen mit oxidativem Stress führt (Rains, J.L. & Jain, S.K. 2011). Unter diabetischen Bedingungen scheinen darüber hinaus AGE, Insulin und Angiotensin II in erhöhter Konzentration vorzuliegen, sodass es über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase zu einem weiteren Anstieg an ROS kommt (Kaneto, H. et al. 2010). In den  $\beta$ -Zellen selbst konnte gezeigt werden, dass ROS die Bindung von PDX1 und/oder MafA an die Promotorregion des Insulingens reduziert und die Aktivität desselbigen sowie die mRNA-Expression supprimiert und die Insulinsekretion herabsetzt. Ähnliche Wirkung zeigt auch die durch ROS gesteigerte Signaltransduktion über die c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK). Zudem kann eine gesteigerte ROS Produktion die Apoptoserate der Zelle erhöhen, was vermutlich mit einer der Ursachen der Zerstörung von  $\beta$ -Zellen beim Diabetes mellitus ist (Kaneto, H. et al. 2010). Die Glykosylierung von Molekülen des antioxidativen Systems, wie etwa Superoxid-Dismutasen oder Esterasen, kann zu einer Inhibition der enzymatischen Aktivität führen. Aber auch die normale Funktion anderer Proteine ist durch Glykosylierung beeinflussbar und kann mit einer veränderten Zellfunktion einhergehen (Rains, J.L. & Jain, S.K. 2011). Hinzu kommt die erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren, die beim Diabetes mellitus Typ 2, der zumeist mit Adipositas vergesellschaftet vorliegt, zu beobachten ist. Sie scheinen die iNOS zu induzieren und zu einer übermäßigen Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion beizutragen. NO an sich ist ein wichtiger Mediator der  $\beta$ -Zell Apoptose, sodass es wahrscheinlich ist, dass dessen Anstieg über die Induktion der Apoptose zu einer Abnahme der  $\beta$ -Zell Masse beim Typ 2 Diabetes mellitus mit beitragen kann. Neben

einer Beteiligung an der pankreatischen  $\beta$ -Zell Dysfunktion, hat sich gezeigt, dass ROS auch in der Progression der Insulinresistenz involviert sind (Kaneto, H. et al. 2010). Eine erhöhte Bildung von ROS in den Mitochondrien wird auch als Ursache von Mutationen im mitochondrialen Genom diskutiert (Kojima, T. et al. 2014).

### **1.6 Mitochondriale DNA**

Mitochondriale DNA (mtDNA) wird ausschließlich maternal auf Nachkommen weiter gegeben (Hemachandra Reddy, P. et al. 2012). Die Aufteilung während der Mitose und Meiose erfolgt willkürlich, sodass die mtDNA im Gegensatz zur nukleären DNA nicht gleichmäßig in den einzelnen Zellen verteilt ist. Innerhalb einer Zellen können multiple Kopien an mtDNA vorliegen (Zhang, L. et al. 2011). Die doppelsträngige mtDNA ist zirkulär in Protein-DNA-Komplexen, den sogenannten Nukleoids, in der inneren Matrix des Mitochondriums lokalisiert (Zhang, L. et al. 2011; Hebert, S.L. et al. 2010). Die Länge der mtDNA variiert je nach Zelltyp zwischen 1 und 30  $\mu$ m (Nass, M.M.K. 1976). Obwohl Mitochondrien ihre eigene DNA besitzen, erfolgt die Codierung ihrer Proteine semiautonom. Die Translationsorte vieler nur für die Mitochondrien bestimmter Proteine sind im Laufe der Entwicklung auf die eukaryotische nukleäre DNA projiziert worden. Die extern codierten Proteine werden nach ihrer Synthese durch spezielle Transporter wieder in das Mitochondrium eingeschleust (Zhang, L. et al. 2011). Das humane mitochondriale Genom an sich ist mit 16,569 bp sehr klein und codiert nur für 37 Gene die direkt oder indirekt in der ATP-Produktion involviert sind (Copeland, W.C. 2012). Darunter 13 Gene die für die Untereinheiten der Atmungskette codieren und innerhalb der mitochondrialen Matrix translatiert werden (Copeland, W.C. 2012). Dazu zählen sieben Gene für die Untereinheiten in Komplex I, ein Gen für die in Komplex III, drei Gene für die in Komplex IV und zwei Gene für die in Komplex V (Dunn, D.A. et al. 2012). Die restlichen 24 Gene codieren für 22 tRNAs und 2 rRNAs (12S und 16S rRNA) die für die mitochondriale Synthese der 13 oben erwähnten Polypeptide benötigt werden (Copeland, W.C. 2012). 93 % der mtDNA sind codierende Bereiche (Cook, C.C. & Higuchi, M. 2012). Darüber hinaus existiert innerhalb der mtDNA ein Bereich in dem eine Drei-Strang-Struktur von etwa 500 Nukleotiden zu finden ist, die sich zusammensetzt aus: den beiden DNA-Strängen der Doppelhelix und einem zum L-Strang komplementären DNA-Stück, dem sogenannten Displacement-loop (D-Loop) (Knippers, R. et al. 1990). Der D-Loop beherbergt den Hauptpromotor für die Transkription des schweren

und leichten Stranges im Genom sowie Bindungsstellen für den mitochondrialen Transkriptions Faktor (mtTFA). Zudem bildet er den Ursprung der Replikation des schweren Stranges (Cook, C.C. & Higuchi, M. 2012). Im Gegensatz zum zytoplasmatischen Genom kommt der mitochondriale Transkriptionsapparat mit 22 unterschiedlichen tRNAs aus. Der Grund hierfür liegt in einer unterschiedlichen Struktur der mitochondrialen tRNA gegenüber der zytoplasmatischen tRNA. Folge dieses Strukturunterschiedes ist eine höhere Flexibilität der Codon-Anticodon Paarung, was dazu führt, dass jede mitochondriale tRNA eine Gruppe von 2 oder 4 synonymen Codons erkennen kann (Abb.9) (Knippers, R. et al. 1990).



**Abb. 9: Schematische Darstellung von Säugetier mtDNA**

Das doppelsträngige zirkuläre Säugetier mtDNA Molekül von etwa 16,5 kb beinhaltet eine einzige längere nicht codierende Region, die Displacement-Loop (D-loop) Region, die die Promotoren für die Transkription beider mtDNA Stränge (HSP und LSP) und den Ursprung der Führungsstrang-Replikation (OH) beherbergt. Der Ursprung der Replikation des leichten Stranges ist eingebettet in einem Cluster von tRNA Genen. Die farbliche Zuordnung der Gene für 2 rRNAs (12 S und 16 S rRNA), 13 mRNAs (ND1-6, ND4L, Cyt b, COI-III, ATP6, und ATP8), und 22 tRNAs ist in den Kästchen links unten im Bild angegeben (Park, C.B. & Larsson, N. 2011).

### 1.7 Mitochondriopathien

Erkrankungen der Mitochondrien werden als Mitochondriopathien bezeichnet. Sie können maternal weitergegeben werden oder entstehen durch Mutationen im mitochondrialen Genom. Ein nicht unerheblicher Faktor für das Auftreten von mitochondrialen



DNA-Deletionen und -Depletionen ist der nukleäre Ursprung einer sich über die Mitochondrien manifestierenden Mutation. Nukleäre Mutationen können einen Einfluss auf die Intaktheit oder Quantität der mtDNA haben und werden autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv an die Nachkommen weitergeben (Naini, A. & Shanske, S. 2007). Betroffen sind vor allem Gewebe, die viel Energie für ihren Funktionserhalt benötigen, wie beispielsweise das zentrale Nervensystem (Tabrizi, S.J. & Schapira, A.H.V. 1999). Die klinische Manifestation der Mitochondriopathien zeigt sich dementsprechend vor allem in Funktionsstörungen des neurologischen und muskulären, wie auch des kardialen Systems. Hinzu kommen, in Abhängigkeit der Störung und deren phänotypischer Ausprägung, verschiedene Syndrome, wie beispielsweise eine externale Ophthalmoplegie beim Kearne-Sayre-Syndrom (Lestienne, P. et al. 1999).

Ätiologisch lassen sich die Mitochondriopathien in drei Kategorien unterteilen (Rotherman, S.M. 1999):

1. Primäre Mutationen der mtDNA, entweder sporadisch auftretend oder maternal vererbt.
2. Nukleäre Mutationen, die zu einer Änderung der mtDNA oder Defekten intergenomischer Signaltransduktion führen.
3. Mendelsche Defekte, die die Atmungskette betreffen, in Abwesenheit mitochondrialer DNA-Mutation.

Die entstandene mitochondriale Dysfunktion führt zur Beeinträchtigung von Calcium-Reserven und zur Bildung freier Radikale. Zudem lässt sich eine Aktivierung der NO-Synthase und der mitochondrialen Permeabilität nachweisen. Diese Mechanismen fördern sowohl die Apoptose wie auch den nekrotischen Zelltod (Flint Beal, M. 1999). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine Öffnung der in der inneren mitochondrialen Membran lokalisierten PT-Poren zu einem Anschwellen der mitochondrialen Matrix führt. Es kommt zu einer Ruptur der äußeren Membran mit Auflösung des Transmembranpotentials und Freisetzung kleiner Moleküle (bis zu 1500 DA) vom Matrixraum über die innere Membran. Es zeigt sich zudem eine gesteigerte Bildung an ROS, die mitochondriale Cardiolipide oxidieren und damit zu einer weiteren Schädigung des Mitochondriums führen (Zamzami, N. et al. 2007). Labordiagnostisch stellt die Hyperlaktazidämie die am häufigsten vorkommende biochemische Abnormalität in Bezug auf mitochondriale Erkrankungen dar. Sie basiert auf einer Dysfunktion der

mitochondrialen Atmungskette. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Muskelgewebe weisen oft intrakristalline Inklusionen auf (Lestienne, P. 1999).

Im Allgemeinen sind die phänotypischen Ausprägungen mitochondrialer Störungen jedoch sehr variabel und abhängig davon, welches Gewebe primär betroffen ist (Minocherhomji, S. et al. 2012). Da innerhalb einer Zelle hunderte bis tausende Kopien mitochondrialer DNA vorhanden sind, können, im Falle einer Mutation, sowohl mutierte wie auch normale mtDNA innerhalb eines Gewebes vorkommen. Dieser Zustand wird auch als Heteroplasmie bezeichnet. Zudem hat sich gezeigt, dass eine bestimmte Anzahl aktiver mutierter DNA vorhanden sein muss, damit sich die Mutation überhaupt klinisch im Phänotyp manifestiert, was als Threshold effect (= Reizschwellen-Effekt) bezeichnet wird. Wie sehr dieses Gleichgewicht hin zu der mutierten mtDNA verschoben sein muss, damit sich die Störung auf Ebene des Genotyps auch im Phänotyp manifestiert, ist gewebeabhängig. Besonders Gewebe, die einen hohen oxidativen Stoffwechsel haben, wie Muskulatur, Gehirn, Herz und Auge, weisen relativ geringe Schwellenwerte auf und sind dementsprechend vulnerabler gegenüber einer Mutation innerhalb der mtDNA. Ein weiterer kaum zu vernachlässigender Faktor ist die mitotische Teilung. Durch sie kann es zu einem Shift im Verhältnis mutierter mtDNA zu normaler mtDNA innerhalb der Tochterzellen kommen, was zu einer Änderung des Phänotyps führen kann (Naini, A. & Shanske, S. 2007). Dies ist ein möglicher Grund, weshalb Mitochondriopathien in jedem Altersabschnitt in Erscheinung treten können. Bei Kindern sind sie oft plurivisceral und manifestieren sich vor allem im ZNS. Meist führen sie bereits in den ersten Lebensjahren oder der Kindheit zum Tod. Bei Erwachsenen treten mitochondriale Erkrankungen hingegen häufig als monoviscerale Myopathien auf (Lestienne, P. 1999).

Defizite innerhalb der Cytochrom-c-Oxidase, einschließlich deren Untereinheit Cox3, werden meist autosomal-rezessiv vererbt und führen zu einer variablen Anzahl an Syndromen wie beispielsweise der fatalen infantilen Myopathie, dem Leigh-Syndrom und Kardiomyopathien (Keightley, J.A. et al. 1996). Mutationen, die die Cox3 Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase betreffen, sind jedoch bisher nur sehr wenige bekannt und der Pathomechanismus kaum verstanden. Bei einigen Probanden mit Leber'scher Optikusneuropathie konnte eine mitochondriale Mutation innerhalb Cox3 nachgewiesen werden. Dabei kam es zu einer Missense Mutation an Position 9438 bzw. 9804 durch Austausch eines Guanins (Johns, D.R. & Neufeld, M.J. 1993). Auch bei Patienten mit rekurrenter Myoglobulinurie und schwerem isolierten COX Defizit zeigte sich eine Assoziation mit

## 1 Einleitung

einem Defekt innerhalb von Cox3. Hierbei konnte eine 15 bp Mikrodeletion nachgewiesen werden, die in 92 % der mtDNA in Muskelzellen und 0,7 % in Leukozyten zu finden war (Keightley, J.A. et al. 1996). Beim Leigh-Like Syndrom konnte in Muskel- und Hautbiopsien ebenfalls eine Mutation innerhalb der Cox3 Untereinheit gefunden werden, bei der es zu einem zusätzlichen Einbau eines Cytosins in Position 9537 der mtDNA gekommen ist. Dies führt zu einer verfrühten Akkumulation von Cytochrom-c-Oxidase Intermediaten ohne dass sich ein funktionsfähiger Komplex zusammen lagert (Tiranti, V. et al. 2000). Phänotypisch kommt es bereits in den ersten Lebensjahren zu einer progressiven spastischen Parese, assoziiert mit einer Ophthalmoparese und moderater Retardierung (Tiranti, V. et al. 2000). Weitere ausgewählte Mitochondriopathien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

|  |
|--|
| <b>Amyotrophe Laterale Sklerose (ALS):</b>   |
| Ursache: 90 % der Fälle sporadische Mutation; 10 % der Fälle familiäre ALS mit möglichen Mutationen u.a. in spezifischen Genen für SOD1. Pathognomisch kommt es zu einer progressiven Degeneration zentraler Motoneurone mit Muskelschwäche, Spastik, Paralyse und Tod, meist durch respiratorisches Versagen, nach 3-5 Jahren ab Diagnosestellung (Parakh, S. et al. 2013).   |
| <b>Friedreich's Ataxie</b>   |
| Es zeigt sich ein Defizit von mitochondrialen Fe-S-Cluster-Enzymen wie den Komplexen I–III der Atmungskette. Zudem steigen im Blut und Urin Marker oxidativer Schädigung an. Ursächlich liegt eine Mutation im Gen 9q21.11 vor, das für das mitochondriale Protein Fratain (FXN) codiert, bei dem es zu einer Expansion einer GAA-Triplet Wiederholung im ersten Intron kommt. Pathognomisch findet sich eine Neurodegeneration der dorsalen Stammganglien. Klinisch kommt es zu einer fortschreitenden spino-cerebellaren und sensorischen Ataxie mit positiven Pyramidenbahnzeichen, Muskelschwäche und Dysarthrie (Martelli, A. et al. 2012).           |
| <b>MIDD (Maternally Inherited Diabetes and Deafness)</b>   |
| Es liegt eine Punktmutation zu Grunde, die eine tRNA im mitochondrialen Genom betrifft. Der Ausfall dieser tRNA kann zu einem kompletten Ausfall der Synthese sämtlicher mitochondrialer Proteine führen. Hierbei kommt es zu einem Defekt der Atmungskette. Je nachdem wie viele Mitochondrien von der Mutation betroffen sind (vergl. Heteroplasmie) ist ein hochgradiger Verlauf mit Verlust der $\beta$ -Zellen möglich. Die Manifestation erfolgt bereits im frühen Erwachsenenalter. Assoziation mit Hochtonschwerhörigkeit im Bereich 4000 Hz ist möglich. Bei manchen Patienten kann die gleiche Mutation zu MELAS führen (Pfeiffer, A.F.H. 2002). |

Tabelle 3: Einige ausgewählte Mitochondriopathien

### 1.8 Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Cox3

Der in dieser Arbeit untersuchte C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Mausstamm weist im Gegensatz zu den C57BL/6NTac Mäusen eine Mutation in der Untereinheit Cox3 der Cytochrom-c-Oxidase auf, bei der es an Position nt9348a zu einer Substitution von Valin gegen Isoleucin gekommen ist.

Die Cox3 ist ein aus 7 Helices bestehendes integrales Transmembranprotein, welches eines der drei mitochondrial codierten Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase bildet (Fontanesi, F. et al. 2006). Untersuchungen an Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*

haben gezeigt, dass es unter anaeroben Bedingungen zu einer 2-3fach gesteigerten Expression der Cox3 mRNA kommt. Eine erhöhte intrazelluläre Glukosekonzentration führt hingegen zu einer Repression der Gene, welche die Information für die mitochondrial codierten Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase beinhalten. Die genaue Funktion von Cox3 ist zurzeit nicht vollständig bekannt (Fontanesi, F. et al. 2006). Es hat sich jedoch gezeigt, dass Cox3 in der Lage ist ein zusammengelagertes Intermediat mit dem Superkomplex aus Cox1, Cox6 und Cox5 der Cytochrom-c-Oxidase auszubilden. Fehlt beispielsweise Cox3, so kommt es zu einer Bildung von nicht stabilen Cox1-5-6-2 Intermediaten (Mick, D.U. et al. 2011). Dies lässt vermuten, dass Cox3 eine wichtige Rolle in der Zusammenlagerung und/oder der Stabilisierung der Untereinheiten 1 und 2 einnimmt (Fontanesi, F. et al. 2006). Ferner scheint Cox3 an der Dimerisierung und katalytischen Aktivität des Enzyms involviert zu sein (Fontanesi, F. et al. 2006).

## 2 Zielstellung der Arbeit

Die Rolle der Untereinheit Cox3 der Cytochrom-c-Oxidase, auch bekannt als Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette, ist bislang nur wenig verstanden. Mutationen in Cox3 haben gezeigt, dass diese Untereinheit möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Ausbildung und Stabilisierung des aus 13 Untereinheiten bestehenden dimeren Komplexes spielen könnte.

Der Metabolismus der Mitochondrien, insbesondere die Funktion der Atmungskette, ist sowohl für die glukosestimulierte Insulinsekretion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas als auch für die Insulinwirkung in Leber und Muskulatur von wesentlicher Bedeutung. Veränderungen im mitochondrialen Metabolismus können, neben einer verminderten Generierung von ATP, durch vermehrt gebildete reaktive Sauerstoffspezies zu einer veränderten Genexpression von Schlüsselenzymen führen.

Kürzlich wurde ein konplastischer Mausstamm generiert, der sich vom Hintergrundstamm C57/6NTac nur durch den nt9348A Polymorphismus in Cox3 der Cytochrom-c-Oxidase unterscheidet, der zu einem Austausch der Aminosäure Valin zu Isoleucin führt (Yu, X. et al. 2009). Dieser C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Mausstamm stellt ein interessantes Modell dar, um den Einfluss einer Mutation in Cox3 der Cytochrom-c-Oxidase auf den Glukosestoffwechsel zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten zu untersuchen. Es war Ziel dieser Studie:

1. Blutglukose und Körpergewicht in C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> im Vergleich zu C57BL/6NTac Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten zu bestimmen,
2. die basale sowie die glukosestimulierte Insulinsekretion von C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> und C57BL/6NTac Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten isolierten  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu analysieren,
3. die Genexpression des mitochondrialen Transkriptionsfaktors Tfam, von Cytochrom c1 und Cox6b1 als nukleär kodierte Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen, des Entkopplerproteins UCP2, der antioxidativen Enzyme Katalase, SOD1 und SOD2, der Pyruvatcarboxylase und der Cyclooxygenase 1 in Leber, Muskulatur sowie  $\beta$ -Zellen des Pankreas in C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> im Vergleich zu C57BL/6NTac Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten zu bestimmen. Die Genexpression im Gehirn, als nicht insulin sensitives Organ, wurde vergleichend untersucht.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Auflistung der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle

| Chemikalien                                       | Bezugsquelle  |
|---|---|
| ALT-Puffer  | QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini Kit, Qiagen, Venlo (NL)  |
| 2/ $\beta$ -Mercaptoethanol ( $C_2H_6OS$ )        | Sigma-Aldrich, Hamburg (D)  |
| BSA   | Albumin Fraktion V, ROTH <sup>®</sup> , Karlsruhe (D)   |
| Calciumchlorid Dihydrat ( $CaCl_2 \times 2H_2O$ ) | Sigma-Aldrich, Hamburg (D)  |
| cDNA Synthesis Kit                                | Maxima <sup>®</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, Fermentas life science, Waltham (Massachusetts, USA) |
| Chloroform/Isoamylalkohol                         | MP Biomedicals, LLC, Illkirch (F)   |
| DNA Mini Kit                                      | QIAamp <sup>®</sup> , QIAGEN, Venlo (NL)  |
| DNase   | RNase-Free DNase Set (50), RNeasy <sup>®</sup> /QIAamp <sup>®</sup> Columns, QIAGEN, Venlo (NL)                       |
| Ethanol, >99 % ( $C_2H_6O$ )                      | Roth, Karlsruhe (D)   |
| Ficoll  | Ficoll <sup>®</sup> PM 400, SIGMA life Science, Hamburg (D)   |
| Glukose ( $C_6H_{12}O_6$ )                        | Calbiochem (Merck), Darmstadt (D)   |
| HEPES ( $C_8H_{18}N_2O_4S$ )                      | Roth, Karlsruhe (D)   |
| Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )           | Meck, Darmstadt (D)   |
| Ketamin 10 %                                      | 100mg/ml Injektionslösung; Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid, bela-pharm (Arzneimittelfabrik), Vechta (D)                |
| Kollagenase                                       | Collagenase NB8; Broad Range from Clostridium histolyticum, SERVA Electrophoresis, Heidelberg (D)                     |
| Magnesiumsulfat ( $MgSO_4$ )                      | Sigma-Aldrich, Hamburg (D)  |
| Mouse Mitochondrial to Nuclear DNA Ratio Kit      | NovaQUANT <sup>™</sup> ; Novagen <sup>®</sup> ; Billerica (Massachusetts, USA)  |
| Natriumcarbonat ( $Na_2CO_3$ )                    | Meck, Darmstadt (D)   |
| Natriumchlorid ( $NaCl$ )                         | Sigma-Aldrich, Hamburg (D)  |
| Natriumhydrogencarbonat ( $NaHCO_3$ )             | Meck, Darmstadt (D)   |
| PBS   | Dulbecco's PBS (10x), PAA-Laboratories GmbH, Pasching (A)   |
| Phenol  | Merck KGaA, Darmstadt (D)   |
| Proteinase K                                      | QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini Kit, Venlo (NL)  |
| RDD-Puffer  | RNase-Free DNase Set (50), RNeasy <sup>®</sup> /QIAamp <sup>®</sup> Columns, QIAGEN, Venlo (NL)                       |
| Rekombinantes Humaninsulin                        | GIBCO <sup>®</sup> (Invitrogen), Darmstadt (D)  |
| RLT-Puffer  | QIAGEN RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit (250), Venlo (NL)   |
| Rompum 2 %  | Injektionslösung (Xylazin), Bayer HealthCare, Leverkusen (D)  |
| Roti <sup>®</sup> -Block                          | Carl ROTH <sup>®</sup> , Karlsruhe (D)  |
| RPE-Puffer  | QIAGEN RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit (250); Venlo (NL)   |

### 3 Materialien und Methoden

|   |   |
|---|---|
| RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin                 | w 2.0 g/L NaHCO <sub>3</sub> , w stavle glutamine, very low endotoxin (weiter hinzuefügt: FCS und DIS), BIOCHROM AG, Berlin (D) |
| RW1-Puffer                                      | QIAGEN RNeasy® Mini Kit (250), Venlo (NL)   |
| Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | J.T. Baker, Deventer (NL)   |
| TaqMan® Master Mix                              | AB Applied Biosystems, Foster City (California, USA)  |
| TMB Chromogen                                   | 1 Step™ Ultra, Thermo Fisher Waltham, Massachusetts (USA)   |
| Tween®20 (C58H114O26)                           | Carl ROTH®, Karlsruhe (D)   |
| Wasser-Nuklease frei                            | Fermentas (Thermo Fisher Scientific), Waltham (Massachusetts, USA)  |

#### 3.1.2 Methodenspezifische Antikörper und Sonden

##### TaqMan®-Sonden

| Sonde                        | Nummer         | Spezies | Herkunft  |
|------------------------------|----------------|---------|---|
| GAPDH                        | Mm99999915_m1  | Maus    | Applied Biosystems, Foster City (California, USA) |
| Cyclooxygenase (COX1)        | Mm01336811_m1  | Maus    | Applied Biosystems, Foster City (California, USA) |
| Cytochrom c-1 (Cyc1)         | Mm00470540_m1  | Maus    | Applied Biosystems, Foster City (California, USA) |
| Cytochrom-c-Oxidase (COX6b1) | Mm00824357_m1  | Maus    | Applied Biosystems, Foster City (California, USA) |
| Katalase                     | Mm01340247_m1  | Maus    | Applied Biosystems, Foster City (California, USA) |
| Pyruvatcarboxylase           | Mm005500992_m1 | Maus    | Applied Biosystems, Foster City (California, USA) |
| SOD1                         | Mm01700393_g1  | Maus    | Applied Biosystems, Foster City (California, USA) |
| SOD2                         | Mm00690588_m1  | Maus    | Applied Biosystems, Foster City (California, USA) |
| Tfam                         | Mm00447485_m1  | Maus    | Applied Biosystems, Foster City (California, USA) |
| UCP2                         | Mm00627599_m1  | Maus    | Applied Biosystems, Foster City (California, USA) |

##### ELISA

| Antikörper-Insulin-ELISA                | Spezies                  | Herkunft  |
|---|--------------------------|---|
| Mouse monoclonal (8E2) to insulin (HRP) | Maus                     | Anti-Insulin antibody [8E2] (HRP) (ab24455), abcam®, Cambridge (UK) |
| Insulin Mouse monoclonal Ab (3A6)       | Maus                     | Anti-Insulin antibody [3A6] (ab 1965), abcam®, Cambridge (UK)       |
| Human-Insulin                           | Saccharomyces cerevisiae | Biomol GmbH, Hamburg (D)  |

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1.3 Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer

##### Lösungen Allgemein

###### **PBS** (PAA-Laboratories GmbH, Pasching, A)

|    |  |
|----|--|
| 1x | 10x PBS Verdünnt mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 |
|----|--|

###### **BSA** (ROTH®, Karlsruhe, D)

|         |  |
|---------|--|
| 10 %ig  | 10 g Albumin auf 100 g mit Aqua dest.    |
| 0,5 %ig | 10 % BSA + Aqua dest. im Verhältnis 1:20 |

###### **RPMI-Medium (PAN)** (BIOCHROM AG, Berlin, D) mit

|           |        |
|-----------|--------|
| FCS       | 50 ml  |
| Pen/Strep | 500 µl |
| Glucose   | 5 mM   |
| Glutamax  | 50 ml  |

##### Krebs-Ringer-Lösungen

###### **Krebs-Ringer-Lösung mit BSA/ pH 7,4**

|  |             |
|--|-------------|
| NaCl                                   | 123,4 mM    |
| KCl                                    | 4,7 mM      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 1,9 mM      |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | 1,2 mM      |
| HEPES                                  | 10,1 mM     |
| NaHCO <sub>3</sub>                     | 20,0 mM     |
| CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O  | 2,6 mM      |
| BSA                                    | 0,5 % (w/v) |

###### **Krebs-Ringer-Lösung mit BSA und 2,8 mM Glukose**

2 ml 140mM Glukose auf 100 ml Krebs-Ringer mit 0,5 % BSA

###### **Krebs-Ringer-Lösung mit BSA und 20 mM Glukose**

300 µl 1 M Glukose auf 15 ml Krebs-Ringer mit 0,5 % BSA

##### Methodenspezifische Lösungen Inselisolation

###### **Narkoselösung**

|                |                |
|----------------|----------------|
| 1,2 ml Ketamin | 10 % 100 mg/ml |
| 0,8 ml Rompun  | 2 % 20 mg/ml   |

###### **Kollagenase**

2 mg Kollagenase auf 1ml Krebs-Ringer + 0,5 % BSA  
2 ml/ Tier



### 3 Materialien und Methoden

#### **Ficoll (SIGMA life Science, Hamburg, D)-Lösungen**

##### **Stammlösungen 25 % Ficoll**

7,5 g Ficoll bis auf 30 g mit 1x PBS auffüllen

##### **Verdünnungsreihe**

23 % Ficoll: 4,6 ml Stammlösung + 0,4 ml 1x PBS

20 % Ficoll: 4,0 ml Stammlösung + 1,0 ml 1x PBS

11 % Ficoll: 2,2 ml Stammlösung + 2,8 ml 1x PBS

#### **Methodenspezifische Lösungen für ELISA**

##### **ELISA-Waschpuffer**

|          |              |
|----------|--------------|
| 1x PBS   |              |
| Tween 20 | 0,05 % (v/v) |

##### **Carbonat-Bicarbonat-Puffer/ pH 9,6**

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 15 mM |
| NaHCO <sub>3</sub>              | 35 mM |

##### **Humaninsulin (Biomol, Hamburg, D)-Verdünnungsreihe 1:1000 in KR + 0,5 % BSA**

| Endkonzentration | Humaninsulin Verdünnung 0,1 ng/ml (µl) | KR + 0,5 % BSA (µl) |
|------------------|--|---------------------|
| 0,0 ng/ml        | 0                                      | 1000                |
| 0,2 ng/ml        | 2                                      | 998                 |
| 0,5 ng/ml        | 5                                      | 995                 |
| 1,0 ng/ml        | 10                                     | 990                 |
| 2,5 ng/ml        | 25                                     | 975                 |
| 5,0 ng/ml        | 50                                     | 940                 |
| 7,5 ng/ml        | 75                                     | 925                 |
| 10,0 ng/ml       | 100                                    | 900                 |

##### **Antikörper ELISA**

Antikörper Insulin Mouse monoclonal Ab (3A6) 1:750 in Carbonat-Bicarbonatpuffer

Antikörper Mouse monoclonal (8E2) to Insulin (HRP) 1:3000 in 0,1x Roti-Block-Lsg.

#### **3.1.4 Geräte und Verbrauchsmittel**

| Materialien                                      | Bezugsquelle  |
|--|---|
| Bulldog-Klemme gebogen 14 mm                     | Aesculap®, Tuttlingen (D)                                       |
| Bulldog-Klemme gerade 16 mm                      | Aesculap®, Tuttlingen (D)                                       |
| Eppendorfgefäß RNase-frei                        | QIAGEN RNeasy® Mini Kit (250), Venlo (D)                        |
| Eppendorfgefäße 0,2 ml                           | Multiply®- Pro Gefäß 0,2 ml, SARSTEDT, Nümbrecht (D)            |
| Eppendorf-Gefäße 1,5 ml                          | 1,5 ml Gefäß, SARSTEDT, Nümbrecht (D)                           |
| Glucometer Free Style Mini                       | Abbott, Wiesbaden (D)   |
| Homogenisator                                    | Janke & Kunkel, Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik, Staufen (D) |
| Inkubator Heraeus (CO <sub>2</sub> -Brutschrank) | Heraeus®, Typ BB 6060 CU, Hanau (D)                             |

### 3 Materialien und Methoden

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| Inkubator Omnilab                     | Memmet, Omnilab, Sartorius, Bremen (D)                  |
| Laborwaage Laboratory LC 620 S        | Sartorius, Göttingen (D)                                |
| Laborwaage Omnilab                    | Sartorius, Göttingen (D)                                |
| Licht-Mikroskop Stemi 2000            | ZEISS, Göttingen (D)                                    |
| Petrischalen (90mm )                  | Cellstar®, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen (D)      |
| Pinzette                              | Aesculap®, Tuttlingen (D)                               |
| Präparierschere                       | Aesculap®, Tuttlingen (D)                               |
| Präzisionswaage                       | Sartorius, Göttingen (D)                                |
| PS-Röhrchen; 15 ml                    | Cellstar®, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen (D)      |
| PS-Röhrchen; 50 ml                    | Cellstar®, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen (D)      |
| RNeasy Mini-Spin                      | QIAGEN RNeasy® Mini Kit (250), Venlo (NL)               |
| QIAshredder-Säule                     | QIAshredder (250), QIAGEN, Venlo (NL)                   |
| Schüttelplatte                        | Omnilab, Sartorius, Bremen (D)                          |
| Spectrophotometer NanoDrop2000        | PeqLab; Erlangen (D)                                    |
| Spritze (Omnican®)                    | B Braun, Omnican®, 1ml, Melsungen (D)                   |
| Stereo-Mikroskop                      | ZEISS, Göttingen (D)                                    |
| Sticks für Glucometer Free Style Mini | Abbott, Wiesbaden (D)                                   |
| TaqMan® Array Plates 96-Well          | TaqMan® Life Technologies™, Carlsbad (California, USA)  |
| Wasserbad Typ: EH                     | Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach (D)                  |
| Zentrifuge Biofuge fresco             | Biofuge primo R, Heraeus®, Hanau (D)                    |
| Zentrifuge Eppendorf 5417             | Centrifuge 5417, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (D)      |
| Zentrifuge Heraeus                    | Biofuge primo R, Heraeus®, Hanau (D)                    |
| Zentrifuge Hettich (Mikro 22R)        | Zentrifugen, Hettich, Kirchlingern (D)                  |
| Zentrifuge Sigma                      | Sigma Laborzentrifugen, 3 K 10, B. Braun, Melsungen (D) |
| 12-Well-Platte                        | Cellstar®, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen (D)      |
| 96-Well-Platte                        | Cellstar®, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen (D)      |

#### 3.1.5 Messgeräte und Programme sowie deren Bezugsquelle

| Messgeräte  | Programme  |
|---|--|
| <b>PCR-Cycler</b>   |  |
| Labcycler, SensQuest GmbH, Göttingen (D)  | Thermo Scientific Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase-Programm |
| <b>Luminometer</b>  |  |
| Victor3™ 1420 Multilab Country, Perkin Elmer, Waltham (Massachusetts, USA)          | Wallac 1420 Manager-Programm                                   |
| <b>Spectrophotometer</b>  |  |
| Nano-Drop2000 Spectrophotometer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen (D)           | NanoDrop2000/2000c, Thermo Scientific                          |
| <b>RT-q PCR</b>   |  |
| 7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City (California, USA) | SDS 2.3-Programm, RQ-Manager 1.2                               |

## 3.2 Verwendete Mausstämme und Tierhaltung

### 3.2.1 Verwendete Mausstämme

Durch Paarung 57 weiblicher mit 52 männlichen Tieren aus dem Bestand von Miss Abbie Lathrop, konnte Dr. C.C. Little in den 1920ern den C57BL/6J Mausstamm (J = Jackson Laboratories) kreuzen, der seitdem fortlaufend in der Forschung verwendet wird (Kiselycznyk, C. & Holmes, A. 2011; Jackson Laboratory 2013). Die C57BL/6J Mäuse (auch als Black 6 oder B6 bezeichnet) lassen sich gut anzüchten, sie leben lange und zeigen eine geringe Anfälligkeit für Tumore. Charakteristisch für diesen Mausstamm ist, dass er eine hohe Anfälligkeit für Diät induziertes Übergewicht, Typ 2 Diabetes und Atherosklerose zeigt (Jackson Laboratory 2013). 1951 wurde aus dem C57BL/6J Stamm im National Institutes of Health (NIH) die Sublinie C57BL/6N separiert ("N" suffix für NIH) (Kiselycznyk, C. & Holmes, A. 2011; Zurita, E. et al 2010). Aus dieser entstand 1991 bei der Firma Taconic die Sublinie C57BL/6NTac (Taconic 2014).

Die NOD Maus wurde 1980 erstmals beschrieben und wird als Tiermodell für den Typ 1 Diabetes mellitus verwendet, da sie aufgrund von Autoimmunprozessen spontan einen Diabetes mellitus entwickelt (Leiter, E.H. et al. 1987). Durch Sequenzierung des mitochondrialen Genoms wurde festgestellt, dass sich die beiden Mausstämme dort durch den nt9348 A Polymorphismus in der Untereinheit 3 der Cytochrom-c-Oxidase unterscheiden (Yu, X. et al. 2009). Dieser führt in der Proteinsequenz zu einem Austausch von Valin zu Isoleucin. Valin und Isoleucin zählen zusammen mit Leucin zu den verzweigt-kettigen, lipophilen Aminosäuren. Ihre chemischen Eigenschaften sowie ihre Strukturformel sind in Tabelle 4 und Abb. 10 dargestellt.

| Aminosäure | Molekülmasse (Da) | Häufigkeit in Proteinen (%) | pI   | Hydrophathieindex |
|------------|-------------------|-----------------------------|------|-------------------|
| Valin      | 117               | 6,6                         | 5,97 | 4,2               |
| Isoleucin  | 131               | 5,8                         | 6,02 | 4,5               |

Tabelle 4: Wichtige Eigenschaften von Valin und Isoleucin (Löffler, G. 2007)

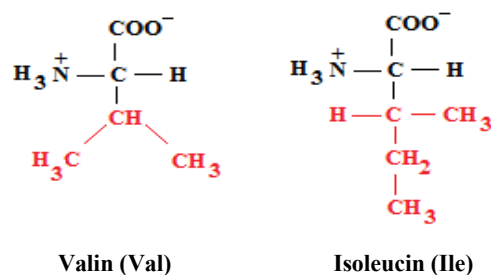


Abb. 10: Strukturformel von Valin und Isoleucin (Löffler, G. 2007)

### 3 Materialien und Methoden

Um den Einfluss der mitochondrialen Mutation bei gleichem, nukleären Hintergrund vergleichen zu können, wurden durch Kreuzung weiblicher NOD Tiere mit männlichen C57BL/NTac über mehr als 10 Generationen der konplastische Mausstamm C57BL/NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> generiert. Allerdings zeigen die Mäuse eine Insertion von Adenin-Nukleotiden an Position 9821 im Gen für den A-Trakt der tRNA-Arginin auf. Dies hat zur Folge, dass innerhalb der Dihydrouracil-Schleife (DHU-Schleife) der tRNA-Arginin im C57BL/6NTac Stamm 9 und im C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Stamm 10 Arginin Wiederholungen vorkommen (Abb. 11) (Ibrahim, S. 2012). Die DHU-Schleife an sich dient der Erkennung der tRNA durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase und spielt damit eine Rolle in der Beladung der tRNA mit ihrer spezifischen Aminosäure (Kim, S.H. et al. 1974). Bei Murphy Roths Large (MRL) Mausstämmen konnte gezeigt werden, dass diese Wiederholungen nicht konstant sind, sondern dass unterschiedliche Längen an Arginin Wiederholungen innerhalb eines Individuums koexistieren und sich mit zunehmenden Alter verändern können (Sachadyn, P. et al. 2008).

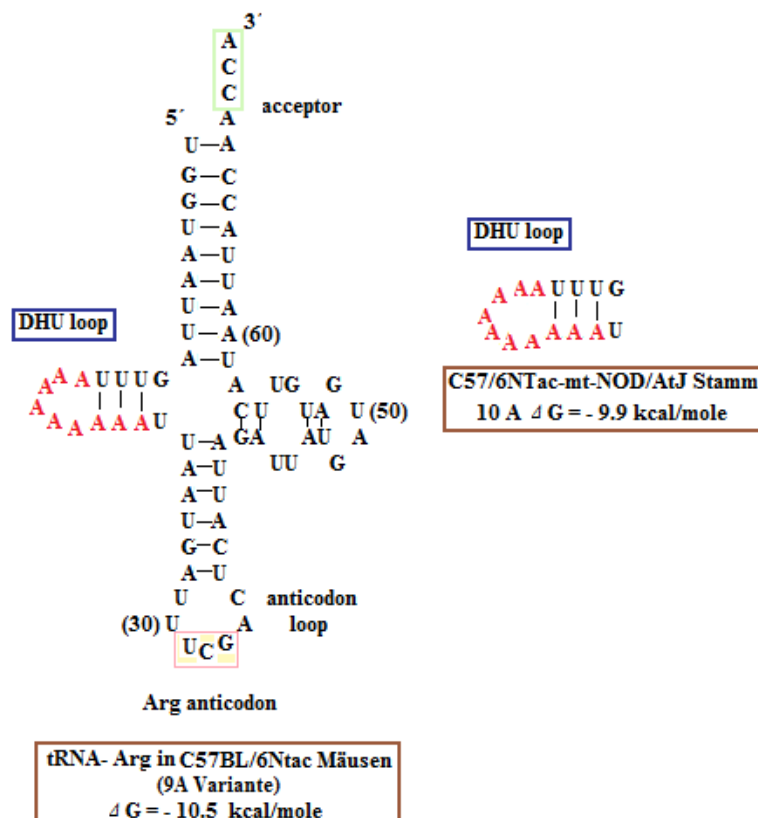


Abb. 11: Unterschiedliche Strukturen des DHU-Loops in der tRNA-Arg im C57BL/6NTac und C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Mausstamm (Sachadyn, P. et al. 2008)

Hinzu kommt, dass die Mutation in Cox3 an einer Stelle lokalisiert ist, die für die Funktion von Komplex IV keinen Einfluss zu haben scheint. Während gesichert ist, dass der Elektronen- und Protonentransport über den Komplex IV vor allem in den Untereinheiten Cox1 und Cox3 stattfindet, ist die genaue Funktion von Cox3 zur Zeit (2014) noch nicht ausreichend geklärt. Somit stellt sich die Frage, in wie fern die Mutation in Cox3 die Funktion von Komplex IV beeinflusst und ob es dadurch überhaupt zu Auswirkungen auf den zellulären Stoffwechsel bzw. die Expression verschiedener Proteine im C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Stamm kommt.

#### **3.2.2 Tierhaltung**

Die C57BL/6NTac (im Weiteren als B6NTac bezeichnet) und C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> (im Weiteren als B6mtNOD bezeichnet) Mausstämme, mit denen gearbeitet worden ist, entstammen beide aus der zentralen Tierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock. Sofern nicht anders vermerkt, erhielten alle Tiere ein kommerzielles, pelletiertes Alleinfuttermittel und Wasser ad libitum. Die Raumtemperatur betrug  $20 \pm 2$  °C bei einer Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 5$  %. Der Hell-Dunkelzyklus betrug jeweils zwölf Stunden und die Tiere waren frei von Viren und anderen Krankheitserregern (nach FELASA-Richtlinien).

#### **3.3 Methodenbeschreibung**

##### **3.3.1 Bestimmung des Körpergewichts**

Das Gewicht der Mäuse ist einmalig vor der Organentnahme am bereits narkotisierten, noch lebenden Tier, mittels einer Laborwaage von Omnilab (Sartorius, Göttingen, D) gemessen worden.

##### **3.3.2 Bestimmung der Blutglukosekonzentration**

Die Blutglukosekonzentration der Mäuse ist vor der Narkotisierung, am noch lebenden Tier, einmalig gemessen worden. Dabei wurde die Schwanzspitze des Tieres eingeritzt und ein kleiner Tropfen Blut (ca. 3 µl) auf einen Teststreifen (Abbott, Wiesbaden, D) gegeben. Zur Messung der Blutglukosekonzentration wurde das Glukosemessgerät Free

Style mini (Abbott, Wiesbaden, D), dass nach der Methode der Glukoseoxidase arbeitet, verwendet.

#### 3.3.3 Isolierung der Pankreasinseln

Für die Entnahme des Pankreas sind die Mäuse zunächst mit einer Narkoselösung (aus 1,2 ml Ketamin und 0,8 ml Rompun; ca. 0,04-0,05 ml für ein 20-25 g schweres Tier) betäubt worden. Es folgte die retrobulbäre Blutentnahme von etwa 0,5–1 ml Blut und die anschließende cervicale Dislokation. Das Tier ist daraufhin mittels eines Scherenschnitts am Bauch, bei dem die Haut wie auch die Bauchmuskulatur durchtrennt wurden, in der Medianen von kaudal (im Bereich der Symphysis pubica) nach kranial (bis zum Processus Xiphoideus des Sternums) aufgeschnitten worden. Anschließend ist der Schnitt kaudal, von der Medianen beginnend, nach links bzw. rechts lateral V-förmig erweitert worden. Die hierbei entstandenen Hautlappen konnten nach kraniolateral umgeklappt werden, sodass das Abdomen mit den darin befindlichen Organen frei lag (Abb. 12).



**Abb. 12: B6mtNOD Maus im Alter von 6 Monaten nach Eröffnung des Abdomens**

Der Leberlappen konnte daraufhin angehoben und die darunter befindliche Duodenalschlinge nach laterokaudal umgeklappt und mittels einer Bulldogklemme (16 mm; Aesculap®, Tuttlingen, D) fixiert werden. Dadurch konnte der Ductus choledochus besser dargestellt und mit einer weiteren Bulldogklemme (14 mm; Aesculap®, Tuttlingen, D) abgeklemmt werden, um im späteren Verlauf zu verhindern, dass die in den Gang gespritzte Lösung in die Leber gelangt. Anschließend wurde der Ductus chole-

dochus mit Hilfe einer Pinzette gespannt und die Papilla duodeni major aufgesucht. Über diese konnte eine Spritze (1 ml Omnicar®, Melsungen, D), aufgezozen mit 1ml Krebs-Ringer-Lösung (+ 0,5 % BSA), in den Gang eingeführt werden (die Spritze wurde hierbei mittels einer Pinzette noch stabilisiert) (Abb. 13). Nach Injektion der Krebs-Ringer-Lösung in den Ductus choledochus, breitete sich diese über den Ductus pancreaticus im gesamten Pankreas aus. Das dadurch „aufgeblasene“ Pankreas konnte im Folgenden heraus präpariert werden.

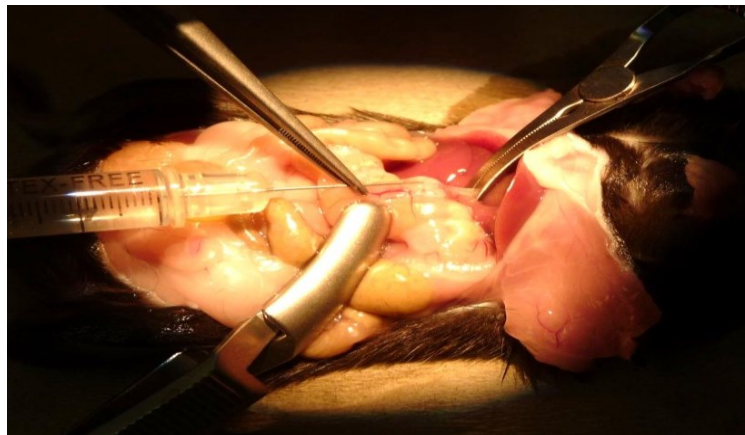
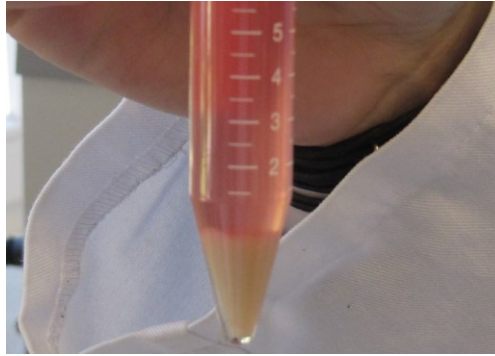


Abb. 13: B6NTac Maus im Alter von 12 Monaten nach Einführung der Spritze in den Ductus choledochus

Das entnommene Pankreas wurde sofort nach der Entnahme in einer kleinen Petrischale klein geschnitten und zusammen mit Krebs-Ringer-Lösung (+ 0,5 % BSA) in ein kleines Schraubdeckelgefäß gegeben. Nachdem sich die Gewebestückchen abgesetzt hatten, wurde die Flüssigkeit darüber mit einer Pipette abgezogen und das Gefäß erneut mit Krebs-Ringer-Lösung (+ 0,5 % BSA) aufgefüllt. Dieser Waschschrift wiederholte sich ein weiteres Mal. Anschließend wurde zum Verdau der Gewebebestandteile Kollagenase (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, D; Konzentration: 2 mg/ml mit 2ml je Pankreas) hinzugefügt und das Glas in ein mit 36 °C warmen Wasser gefülltes Warmbad (Julabo Labortechnik, Seelbach, D) gegeben. Die Suspension wurde alle 2 Minuten kräftig geschüttelt. In Abhängigkeit vom Alter der Tiere wurde der Verdau nach ca. 11-16 Minuten durch Zugabe von RPMI 1640-Medium abgestoppt und das Gefäß für ca. 7 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überstand wurde abgezogen und der Niederschlag mit RPMI-Medium wieder neu resuspendiert. Darauf folgend ist die Lösung in ein 15 ml PS-Röhrchen (Cellstar®, Frickenhausen, D) gefüllt und für 2 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert (Laborzentrifuge, Braun, Melsungen, D) worden. Es bildete sich dabei ein Pellet (Abb. 14), welches nach Abgießen des Überstandes in 4 ml einer 25 % igen Ficoll-Lösung wieder resuspendiert wurde.





**Abb. 14:** Bildung eines Pellets nach zweiminütiger Zentrifugation bei 1000 rpm

Daraufhin konnte ein Gradient, bestehend aus verschiedenen Ficoll-Konzentrationen, aufgebaut werden. Auf das bereits in 25 % igem Ficoll gelöste Pellet wurden, in der angegebenen Reihenfolge, folgende Ficoll-Lösungen überschichtet: 2 ml 11 % ige, 3 ml 20 % ige und 3 ml 23 % ige. Nach zehnmütigem Zentrifugation bei 20 °C, ohne Bremse bei 800 g, wurde die Phase zwischen der 11 % igen und 20 % igen Ficoll-Lösung entnommen und in ein 50 ml PS-Röhrchen (Cellstar®, Frickenhausen, D) gegeben. Das Röhrchen wurde mit Medium aufgefüllt und 2 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert (Biofuge primo R, Heraeus®, Hanau, D). Hierbei bildete sich erneut ein Pellett, welches nach Abkippen des Überstandes in ca. 20 ml RPMI 1640-Medium resuspendiert wurde. Unter dem Stereo-Mikroskop (ZEISS, Göttingen, D) wurden die durch dieses Verfahren aus dem Pankreas isolierten Langerhans'schen Inseln herausgepickt und in RPMI 1640-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung über Nacht in einem Zellkulturinkubator (Heraeus®, Hanau, D) kultiviert.

#### **3.3.4 Entnahme weiterer Organe**

Unmittelbar nach der Entnahme des Pankreas aus der Maus, wurden ca. 50 mg schwere Proben von abdominalem Fettgewebe, Lobus hepatis sinister, Duodenum und Musculus femoralis für die spätere RNA-, DNA- und Protein-Isolation sowie die Anfertigung von Kryoschnitten entnommen und sofort im flüssigen Stickstoff eingefroren. Eine weitere Probenentnahme erfolgte aus dem Gehirn. Hierbei wurde die Maus auf den Bauch gedreht und der Schädel mit Hilfe einer Pinzette fixiert. Die Schädeldecke konnte nun occipital beginnend mit einer Schere aufgeschnitten und vorsichtig entfernt werden. Das so freigelegte Gehirn wurde herauspräpariert und im Bereich der Fissura longitudinalis in zwei Hälften geteilt. Eine der Gehirnhälften ist für spätere Kryoschnitte im Ganzen weggefroren worden. Die verbleibende Gehirnhälfte wurde in zwei gleichgroße Stücke



für RNA- und Proteinisolation aufgeteilt. Die so erhaltenen Proben der verschiedenen Organe wurden anschließend in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen im  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  Gefrierschrank gelagert.

#### **3.3.5 Messung der Insulinsekretion**

##### **3.3.5.1 Ex vivo Stimulation der isolierten Pankreasinseln**

Die am Vortag isolierten Langerhans'schen Inseln wurden zu 20 Inseln pro Well auf 12-Well-Platten (Cellstar®, Frickenhausen, D) aufgeteilt. Jedes Well wurde daraufhin mit 1 ml 2,8 mM Glukose haltiger Krebs-Ringer-Lösung (+ 0,5 % BSA) aufgefüllt und die Platte für 30 Minuten bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $-\text{CO}_2$ -Sättigung inkubiert. Anschließend wurde die Krebs-Ringer-Lösung entfernt und frischer Puffer hineingegeben. Nach erneuter Entfernung der Lösung wurde 1 ml Krebs-Ringer-Lösung (+ 0,5 % BSA) ohne Glukose in jedes Well gegeben und 1 Stunde inkubiert. Die Lösung wurde wiederum entfernt und es folgte die Inkubation der Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Lösung mit unterschiedlicher Glukosekonzentration für 2 Stunden. Hierbei verwendet worden sind:

**A** Basale Insulinsekretion: 2,8 mM Glukose-haltige Krebs-Ringer-Lösung (+ 0,5 % BSA)

**B** Stimulierte Insulinsekretion: 20 mM Glukose-haltige Krebs-Ringer-Lösung (+ 0,5 % BSA)

Als Nächstes wurde der Überstand in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und kurz anzentrifugiert. Der dabei gebildete Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert. Die Inseln sind, in einem Eppendorfreaktionsgefäß vereinigt, zweimal mit Krebs-Ringer-Lösung ohne BSA gewaschen und anschließend bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert worden. (Alle Inkubationsschritte erfolgten bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $-\text{CO}_2$ -Sättigung im Brutschrank von Heraeus®, Hanau, D).

##### **3.3.5.2 Bestimmung Insulinkonzentration mittels ELISA**

Zur Bestimmung der Menge an sezerniertem Insulin wurde ein ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) nach der Sandwich-Methode mit enzymvermittelter Farbreaktion durchgeführt. Dabei bindet ein erster Antikörper (Coating-Antikörper; Mouse monoclonal AB (3A6)) an die Oberfläche der verwendeten Mikrotiterplatte sowie an ein spezifisches

Epitop des in der Probe enthaltenen Insulinmoleküls. Es folgt die Zugabe eines zweiten Antikörpers (Detektions-Antikörper; Mouse monoclonal (8E2) to Insulin (HRP)), der im Vergleich zum ersten Antikörper spezifisch an einen anderen Bereich des Insulinmoleküls bindet, sodass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. An dem zweiten Antikörper ist zudem das Enzym Meerrettich Peroxiase (HRP) gekoppelt, welches Chromogen-3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) enzymatisch umwandelt. Durch diese Farbreaktion kann das in der Probe enthaltene Insulin detektiert werden. Die Farbreaktion kann mit Schwefelsäure abgestoppt und der dabei stattfindende Farbumschlag bei 450 nm gemessen werden. Die Quantifizierung des Insulingehalts erfolgt abschließend über die mitgeführten Insulinstandarts bekannter Konzentration.

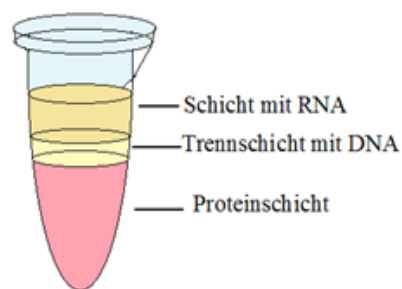
In einer 96-Well Platte (Cellstar®, Frickenhausen, D) wurden im ersten Schritt 20 µl pro Well des mit Carbonat-Bicarbonat Puffers verdünnten Insulin-Antikörpers (Insulin Mouse monoclonal Ab (3A6) von abcam®, Cambridge, UK; Verdünnung auf 1:300 mittels Carbonat-Bicarbonat-Puffer mit pH 9,6) aufgetragen. Die Platte wurde in einer feuchten Kammer für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Daraufhin sind die Wells 3x mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen worden. Im nächsten Schritt wurden pro Well 100 µl 1x Roti-Block-Lösung hinzugegeben und die abgedeckte Platte für 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Ein erneuter Waschvorgang mit 3x Waschpuffer schloss sich an. Daraufhin konnte die mit Human-Insulin (Biomol GmbH, Hamburg, D) angesetzte Insulin-Standartreihe (Verdünnungsreihe von 0 ng/ml bis 10 ng/ml Human-Insulin mit Krebs-Ringer-Lösung mit 0,5 % BSA) zusammen mit den zu untersuchenden Proben, auf die Platte aufgetragen werden (20 µl pro Loch). Es folgte eine erneute Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden 20 µl pro Well des HRP-gekoppelten Insulin Antikörper (Mouse monoclonal (8E2) to Insulin (HRP) von abcam®, Cambridge, UK; Verdünnt auf 1:3000 in 0,1x Roti-Block-Lösung) hinzugegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut mit 3x 100 µl Waschpuffer gewaschen. Für die abschließende Farbreaktion wurden 50 µl pro Well des TMB-Chromogen (Waltham, Massachusetts, USA) auf die Platte aufgetragen und diese anschließend, mit Alufolie abgedunkelt, für 15 Minuten auf eine Schüttelplatte gestellt. Die Reaktion ist mit 50 µl 1N Schwefelsäure pro Well gestoppt worden. Die in diesem Zeitraum umgesetzte Menge an TMB-Chromogen ist hierbei proportional zur verdünnten Insulinmenge. Die Messung der Absorption erfolgte in einem Mikrotitrierplatten-Photometer von Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) bei 450 nm. Berechnet wurde der Insulingehalt mittels der Cubic spline Regression des GraphPad Prism-

Programms. (Die Inkubationsschritte bei 37 °C erfolgten alle im Inkubator von Sartorius, Bremen, D).

#### 3.3.6 mRNA-Expressionsanalysen

##### 3.3.6.1 RNA-Extraktion aus den Geweben

Die Extraktion der RNA aus Gewebeproben erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini-Kits (QIAGEN RNeasy®, Venlo, NL). Hierzu wurden ca. 25 mg schwere Stücke der bei – 70 °C gelagerten Gewebeproben in einem Gemisch aus 10 µl 2ß-Mercaptoethanol und 1 ml RLT-Puffer mittels eines Homogenisators (Ultra-Turrax T25, Staufen, D) zerkleinert. Dadurch konnte die in den Zellen und Organellen enthaltene RNA freigelegt werden. Um diese weiter von dem im Gemisch noch enthaltenen Proteinen zu isolieren, wurde das Homogenisat zusammen mit 200 µl Phenol sowie 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und 15 Minuten lang mit 14.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge Mikro 22R, Hettich, Kirchlingern, D). Dabei bildeten sich 3 Phasen: eine Schicht aus Proteinen (untere Phase), darauf eine Trennschicht in der sich die DNA befindet sowie eine Schicht mit RNA (obere Phase) (Abb. 15).



**Abb. 15: Phasentrennung nach Zentrifugation des Homogenisats zusammen mit 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform/ Isoamylalkohol**

Die obere Phase, welche die RNA enthält, wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß mit 500 µl 70 % Ethanol gegeben. Dieses Gemisch wurde anschließend auf die Säule des RNeasy Mini-Kits gegeben und für 15 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das in der Lösung enthaltene Ethanol sorgt hierbei für eine bessere Bindung der RNA an die Silicamembran der Säule. Der Durchfluss, der sich nach dem Zentrifugieren in dem Tube gebildet hat, wurde verworfen. Um noch vorhandene DNA auf der Silcamembran zu entfernen erfolgte anschließend der DNA-Verdau mit dem

RNase-Free DNase Set (QIAGEN RNeasy®, Venlo, NL). Dabei wurde ein Gemisch aus 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer direkt auf die Membran aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 25 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Tube bei 12.000 rpm an zentrifugiert und der dabei gebildete Durchfluss wieder verworfen. Die Elution erfolgte mit Rnase-freiem Wasser durch ein minütige Zentrifugation. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mittels NanoDrop 2000 von PeqLap. Im Anschluss wurde die Membran mit 500ml RW1 Puffer und 2mal mit 500ml RPE Puffer gewaschen. Die RNA wurde anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C eingelagert.

#### **3.3.6.2 RNA-Extraktionen aus Langerhans'schen Inseln**

Die bei -70 °C gelagerten, aufgetauten Inseln wurden in 350 µl eines Lysepuffers bestehen aus RLT-Puffer (aus dem QIAGEN Kit) und 2ß-Mercaptoethanol gegeben (Verhältnis 100: 1). Nach gutem Vortexen ist das Lysat auf eine QIAshredder-Säule (QIAGEN, Venlo, NL) pipetiert und 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert worden. Der dabei gebildete Durchfluss wurde zusammen mit 350 µl 70 % igem Ethanol auf die Membran einer Rneasy Mini Kit Säule aufgetragen und für 15 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der weitere Verlauf sowie die Bestimmung des Reinheitsgrades und der RNA-Konzentration stimmen mit dem der RNA-Isolation aus den Geweben in Punkt 3.3.6.1 überein. Das Eluat ist bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C gelagert worden.

#### **3.3.6.3 cDNA – Synthese: Erster Schritt der RT-qPCR**

Die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA mittels reverser Transkriptase wurde mit dem Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Massachusetts, USA) durchgeführt. Für die cDNA-Synthese-Reaktion wurden von den Gewebeproben (Leber, Muskel, Gehirn) je 200 ng RNA eingesetzt. Für die cDNA-Synthese der Langerhans'schen Inseln wurden jeweils 100 ng RNA verwendet. Dabei ist folgender Reaktionsansatz verwendet worden:

- 2 µl Enzymmix
- 4 µl Reaktionsmix
- x µl RNA (200 ng)
- ad. 20 µl dH<sub>2</sub>O

### 3 Materialien und Methoden

---

Zur anschließenden Umschreibung in cDNA im Thermocycler ist das MAXIMA®-Programm mit folgenden Schritten durchlaufen worden:

|                   | Zeit (min) | Temperatur (°C) |
|-------------------|------------|-----------------|
| <b>1. Schritt</b> | 10         | 25.0            |
| <b>2. Schritt</b> | 15         | 50.0            |
| <b>3. Schritt</b> | 5          | 85.0            |
|                   | ∞          | 4.0             |

Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der cDNA bei –20 °C.

#### 3.3.6.4 Real-Time quantitative PCR (RT- qPCR)

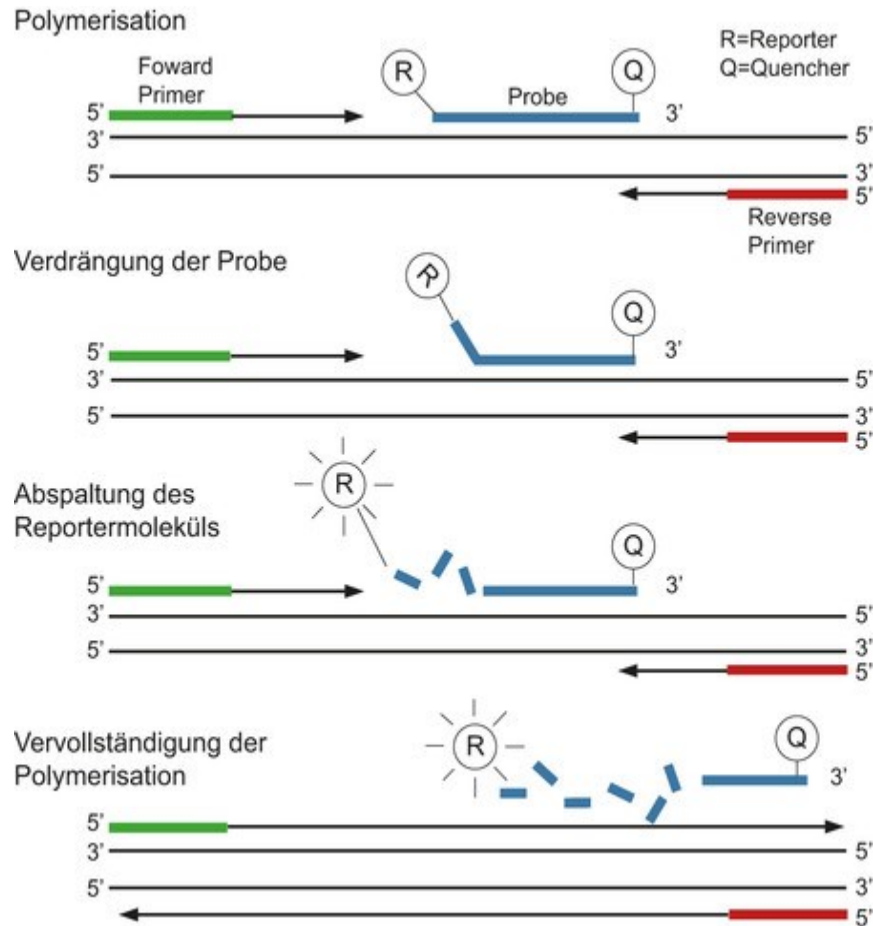
Um die mRNA-Expression zu quantifizieren wurde die Real-Time qPCR mittels TaqMan®-PCR-Technologie verwendet. Grundlage dieser Methode ist die Kombination aus reverser Transkriptase und der Polymerase-Kettenreaktion. Für dieses Verfahren werden spezifische TaqMan®-Sonden benötigt. Dies sind Oligonukleotid-Sonden mit folgenden Charakteristika:

- nicht fluoreszierender 3'-Quencher-Farbstoff
- fluoreszierender 5'-Reporter-Farbstoff
- 3'-minor groove binder (MGB)

Die zu untersuchende doppelsträngige cDNA wird unter Erhitzung im Thermocycler in zwei Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung), sodass im nächsten Schritt spezifische Primer an eine komplementäre Sequenz des cDNA Single-Strangs binden können (Annealing). Auch die verwendeten Taqman-Sonden lagern sich an ausgewählte komplementäre Basenfolgen an die Ziel-DNA (Target-DNA) in der Nähe des Primers an. Sofern die Sonde dabei einzeln oder an den DNA-Strang gebunden vorliegt, kann kein Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes gemessen werden. Grund dafür ist dessen Unterdrückung durch den benachbarten Quencher-Farbstoff. Es folgt die Elongation des cDNA-Stranges über die hinzugegebenen DNA-Bausteine (Gemisch aus Desoxynukleosid-Triphosphaten) vom 3'-Ende beginnend durch die DNA-Polymerase. Die verwendete Taq-DNA-Polymerase verfügt neben ihrer Polymerase-Aktivität auch über eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Dies führt während der Synthese des komplementären Stranges zum Abbau der TaqMan-Sonde am 5'-Ende und zur Trennung von Quencher und Fluorophor voneinander. Es kommt somit zu einer Steigerung der Reporter-

### 3 Materialien und Methoden

Fluoreszenz, die am Ende der Elongation, in der exponentiellen Phase der PCR, in jedem Zyklus gemessen werden kann (Abb. 16). Hierbei korreliert die gemessene sequenz-spezifische Intensität der Fluoreszenz proportional mit der Quantität des Amplikons.



**Abb. 16: Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR**

Die TaqMan Sonde, die an die Zielsequenz zwischen den beiden PCR-Primern hybridisiert, enthält einen Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und einen Quencher Farbstoff am 3'-Ende. Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher supprimiert die Fluoreszenz. Während der PCR-Reaktion wird durch die 5'-3' Exonuklease Aktivität der DNA-Polymerase die Sonde vom 5'-Ende her von der Zielsequenz verdrängt und der Reporter vom Quencher getrennt. Erst jetzt kann die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden. Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz ist proportional zu der Entstehung von PCR-Produkten. (Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik (MVZ); <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=8688>)

Als Reporter-Farbstoff wird hierbei standardmäßig FAM™ (6-Carboxy-Fluorescein) eingesetzt. Für spätere Berechnungen gilt als Referenzwert das ubiquitär vorkommende Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). In dieser Arbeit sind frequenz-spezifische Sonden für folgende Gene verwendet worden: den mitochondrialen Transkriptionsfaktor Tfam, Cytochrom c1 und Cox6b1 als nukleär kodierte Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen, das Entkopplerprotein UCP2, die antioxidativen Enzyme

### 3 Materialien und Methoden

---

Katalase, SOD1 und SOD2, die Pyruvatcarboxylase sowie die Cyclooxygenase 1 (Alle-samt von Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Für die Messungen wurde in eine 96-Well-Platte (Life Technologies™, Carlsbad, California, USA) folgender Reaktionsansatz gegeben:

- 6 µl Aqua dest.
- 5 µl 2x TaqMan®- Universal PCR Master Mix
- 1 µl TaqMan Sonde
- 1 µl cDNA

Für die Detektion erfolgte die Durchführung der Quantitativen Real Time PCR im Applied Biosystem 7900HT Fast Real-Time-PCR Cycler unter folgendem Programm:

| PCR-Schritt | Dauer  | Temperatur |
|-------------|--------|------------|
| Hold        | 2 min  | 50 °C      |
| Hold        | 10 min | 95 °C      |
| 45 Zyklen   | 5 s    | 95 °C      |
|             | 1 min  | 60 °C      |

Der PCR-Lauf ist mit dem SDS 2.3-Programm erstellt und anschließend über den RQ Manager 1.2 abgelesen worden. Die quantitative Auswertung erfolgte dabei nach der  $\Delta\Delta\text{-Ct}$ -Methode. Der Ct (Cycle of treshold)-Wert stellt hierbei eine theoretische Größe dar, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Um die Variationen der eingesetzten mRNA auszugleichen, erfolgte eine interne Kontrolle zur relativen Quantifizierung durch das ubiquitär vorkommende Referenzgen GAPDH. Der Ct-Wert dieses Referenzgens ist vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert worden ( $\Delta\text{-Ct}$ ). Anschließend konnte durch die Ermittlung der Expressions-änderung einer Zielsequenz der Probe relativ zur gleichen Zielsequenz der Kontrolle  $\Delta\Delta\text{-Ct}$  bestimmt werden.

$$\begin{aligned}\Delta\text{-Ct} &= \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}} \\ \Delta\Delta\text{-Ct} &= \Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}\end{aligned}$$

#### **3.3.7 DNA Extraktion und Bestimmung der relativen mtDNA Kopienanzahl**

##### **3.3.7.1 DNA Extraktion aus Gewebeproben**

Für die Gewinnung von sowohl genomischer als auch mitochondrialer DNA wurde der QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Hierfür wurden 15 mg der tiefgefrorenen Leberproben zerkleinert und anschließend mit 180 µl ALT Puffer und 20 µl Proteinase K versetzt. Die Probe wurde kurz anzentrifugiert und anschließend eine Stunde bei 56 °C bei 1400 rpm geschüttelt. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Kits. Die DNA wurde über drei aufeinanderfolgende Elutionsschritte mit je 25 µl gewonnen und die Konzentration mit Hilfe des NanoDrop<sup>™</sup> Spektrometers bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei –20 °C.

##### **3.3.7.2 Relative Bestimmung der mtDNA Kopienanzahl**

Die relative Bestimmung der mtDNA Kopienanzahl erfolgte mit Hilfe des NovaQUANT<sup>™</sup> Mouse Mitochondrial to Nuclear DNA Ratio Kit der Firma Novagen<sup>®</sup>. Die hierbei durchgeführten Real-Time PCRs erlauben eine quantitative Analyse und vergleichen die Kopienanzahl der mtDNA mit der genomischer DNA. Die Analyse erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers, wobei je 2 ng DNA für die RT-PCR eingesetzt wurden. Für die Auswertung wurde die im Protokoll beschriebene Methode zur Bestimmung der relativen Kopienanzahl verwendet.

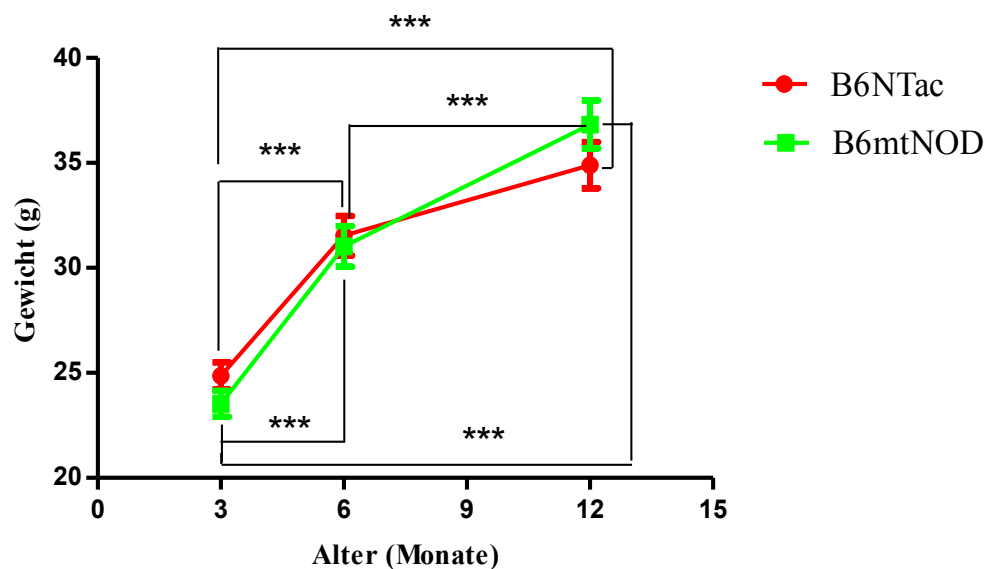


### 4 Resultate

In dieser Arbeit wurde mit zwei unterschiedlichen Mausstämmen gearbeitet: den B6NTac (C57BL/6NTac) und den B6mtNOD (C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup>) Mäusen. Beide Stämme sind zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monaten untersucht worden. Das Verhältnis der männlichen zu den weiblichen Tieren lag in beiden Genotypen bei etwa 1:1.

#### 4.1 Gewicht

In beiden Mausstämmen zeigte sich zwischen den 3 und 6 Monate alten Tieren eine signifikante Gewichtszunahme (3 Monate B6NTac:  $24,86 \pm 4,56$  g vs. 6 Monate B6NTac:  $31,82 \pm 6,09$  g; 3 Monate B6mtNOD:  $23,54 \pm 4,43$  g vs. 6 Monate B6mtNOD:  $31,10 \pm 7,11$  g; Abb. 17). Hierbei unterschieden sich die Werte beider Stämme nicht. Ein weiterer Gewichtsanstieg zeigte sich in beiden Genotypen zwischen dem 6. und 12. Lebensmonat. Im Gegensatz zu den B6NTac Tieren fiel dieser in der Gruppe der B6mtNOD Mäuse signifikant aus (6 Monate B6mtNOD:  $31,10 \pm 7,11$ g vs. 12 Monate B6mtNOD:  $36,83 \pm 7,21$  g; Abb. 17). In beiden Mausstämmen konnte eine signifikante Gewichtszunahme zwischen den 3 und 12 Monate alten Tieren beobachtet werden (3 Monate B6NTac:  $24,86 \pm 4,56$  g vs. 12 Monate B6NTac:  $34,89 \pm 7,6$  g; 3 Monate B6mtNOD:  $23,53 \pm 4,42$  g vs. 12 Monate B6mtNOD:  $36,83 \pm 7,21$  g; Abb. 17).



**Abb. 17: Gewicht der gesamten B6NTac und B6mtNOD Tiere**

Dargestellt ist das arithmetisch gemittelte Gewicht der B6NTac und B6mtNOD Tiere im Alter von 3 (n = 20-22), 6 (n = 22-23) sowie 12 Monaten (n = 19-26). Die Messung ist am Tag der Organentnahme am noch lebenden bereits narkotisierten Tier erfolgt. \*\*\*P < 0,001 (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.2 Blutglukosekonzentration

In beiden untersuchten Mausstämmen konnte ein Anstieg der Blutglukosekonzentration zwischen den 3 und 6 Monate alten Tieren ermittelt werden, wobei die Absolutwerte der B6mtNOD Gruppe unter denen der B6NTac Mäuse vergleichbaren Alters lagen (Abb. 18). Im B6NTac Stamm fiel dieser Anstieg im Gegensatz zum B6mtNOD Stamm signifikant aus (3 Monate B6NTac:  $6,32 \pm 1,09$  mmol/l vs. 6 Monate B6NTac:  $6,76 \pm 1,11$  mmol/l; Abb.18). Zwischen den 6 und 12 Monate alten Tieren kam es bei den B6mtNOD Tieren nur zu einer leichten Abnahme der Blutglukosekonzentration. Im B6NTac Kontrollstamm konnte im Vergleich dazu ein signifikanter Abfall der Blutglukosekonzentration beobachtet werden (6 Monate B6NTac:  $6,76 \pm 1,11$  mmol/l vs. 12 Monate B6NTac:  $5,53 \pm 0,98$  mmol/l; Abb. 18). Damit lag die Blutglukosekonzentration der 12 Monate alten B6NTac Mäuse noch unter dem Wert der gleichaltrigen B6mtNOD Tiere bzw. signifikant unter der Blutglukosekonzentration der 3 Monate alten Tiere gleichen Genotyps (3 Monate B6NTac:  $6,32 \pm 1,09$  mmol/l vs. 12 Monate B6NTac:  $5,53 \pm 0,98$  mmol/l; Abb.18).

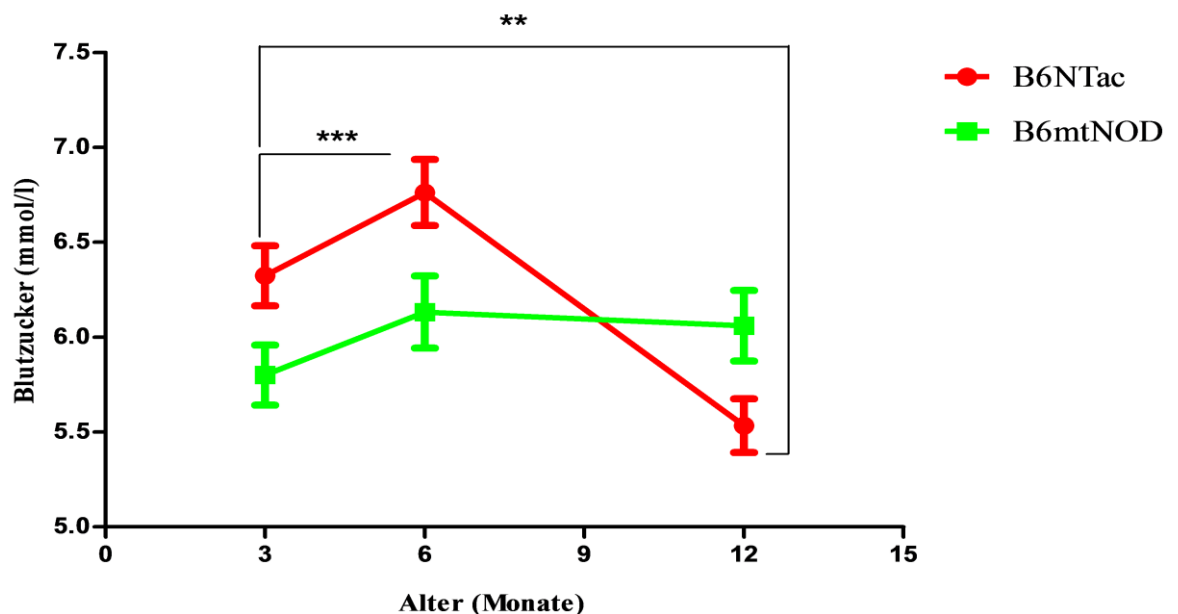


Abb. 18: Blutglukosekonzentration der B6NTac und B6mtNOD Tiere

Dargestellt ist der arithmetisch gemittelte Blutglukosespiegel der gesamten B6NTac und B6mtNOD Tiere im Alter von 3 (n = 49-50), 6 (n = 35-37) sowie 12 Monaten (n = 41-48). \*\*\*P < 0,001; \*\*P < 0,01 (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.3 Insulinsekretion

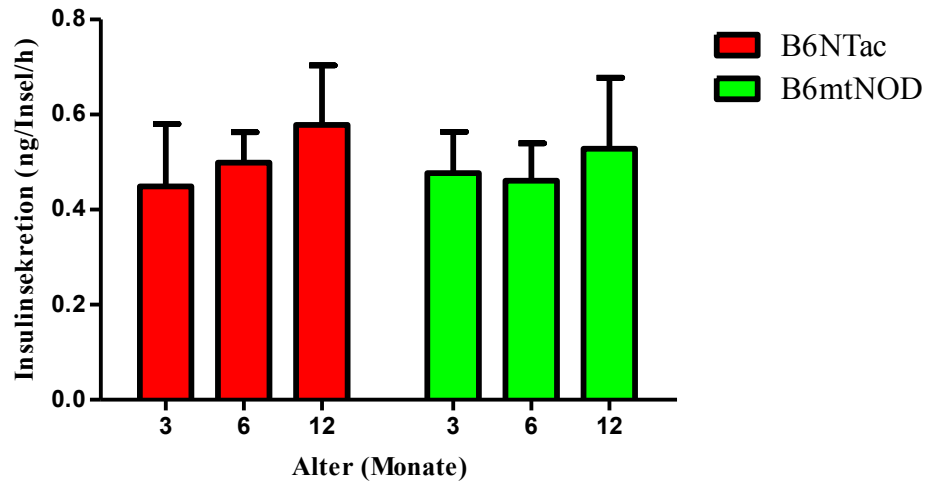
Aus dem Pankreas beider Mausstämmen wurden die Langerhans'schen Inseln isoliert und anschließend mittels ELISA die basale sowie die glukosestimulierte Insulinsekretion bestimmt.

#### 4.3.1. Basalsekretion der Inseln

Sowohl im B6NTac wie auch im B6mtNOD Stamm lag die basale Insulinsekretion, bei Inkubation mit 2,8 mM Glukose-Lösung, in beiden Mausstämmen und zwischen den 3 und 6 Monate alten Tieren gleichen Genotyps, auf einem ähnlichen Niveau (Abb. 19). Es folgte ein leichter Anstieg der Insulinsekretion bei den 12 Monate alten Tieren (Abb. 19). Die Sekretion im B6NTac Stamm lag hierbei nur gering über jener der gleichaltrigen B6mtNOD Tiere. Signifikante Unterschiede konnten jedoch weder innerhalb noch zwischen den beiden Mausstämmen ermittelt werden.

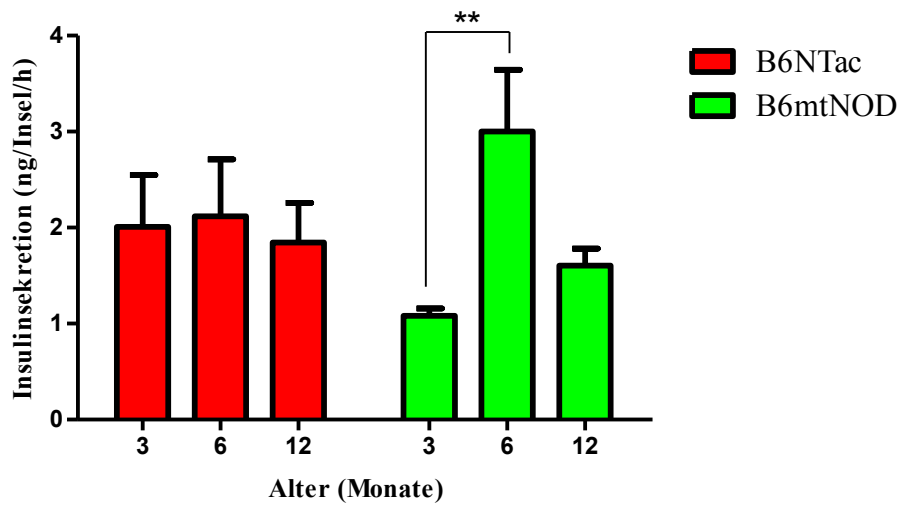
#### 4.3.2. Stimulation der Inseln mit 20 mM Glukose-Lösung

Im Vergleich zur Basalinsulinsekretion zeigte sich auf die Stimulation der isolierten Inseln mit der 20 mM Glukose-Lösung ein Anstieg der Insulinsekretion. In den B6NTac Tieren konnte keine altersabhängige Veränderung der glukosestimulierten Insulinsekretion beobachtet werden. Im Gegensatz dazu stieg die Insulinsekretion bei den 6 Monate alten B6mtNOD Tieren im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren signifikant an (3 Monate B6mtNOD:  $1,09 \pm 0,35$  ng Insulin/Insel/h vs. 12 Monate B6mtNOD:  $1,60 \pm 0,65$  ng Insulin/Insel/h; Abb. 20). Die Insulinsekretion war dagegen bei den 12 Monate alten Tieren wieder niedriger. Der Wert lag allerdings noch oberhalb der Sekretion der 3 Monate alten Tiere gleichen Genotyps (Abb. 20). Insgesamt betrachtet befand sich die Insulinsekretion der 3 und 12 Monate alten B6NTac Tiere über derjenigen der B6mtNOD Gruppe vergleichbaren Alters. Bei den 6 Monate alten Mäusen kam es jedoch zu einer stärkeren Insulinsekretion im B6mtNOD Stamm gegenüber der B6NTac Kontrollgruppe.



**Abb. 19: Basale Insulinsekretion der aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen isolierten Inseln**

Dargestellt ist die arithmetisch gemittelte Insulinsekretion der aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen isolierten Inseln im Alter von 3 (n = 3-4), 6 (n = 3-4) sowie 12 Monaten (n = 3-4) nach Inkubation in Krebs-Ringer-Lösung (+ 0,5 % BSA) mit 2,8 mM Glukose.



**Abb. 20: Glukosestimulierte Insulinsekretion der aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen isolierten Inseln**

Dargestellt ist die arithmetisch gemittelte Insulinsekretion der aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen isolierten Inseln im Alter von 3 (n = 3-4), 6 (n = 3-4) sowie 12 Monaten (n = 3-4) nach Inkubation in Krebs-Ringer-Lösung (+ 0,5 % BSA) mit 20 mM Glukose. \*\*P < 0,01 (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4 Genexpressionsanalysen

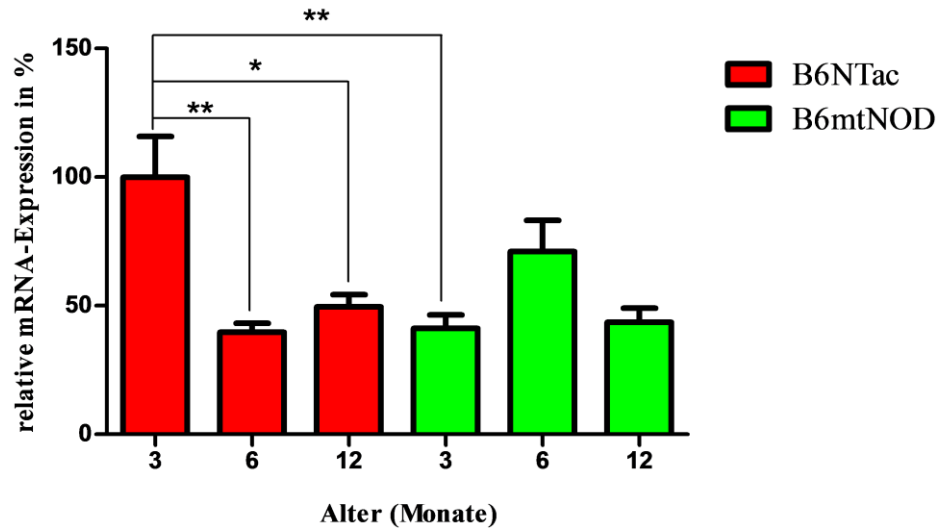
Die relative Expression ausgewählter Enzyme in den B6NTac und B6mtNOD Mäusen wurde mittels Real-Time qPCR Analysen ermittelt. Untersucht worden sind je Genotyp Leber, Gehirn und Muskel ( $n = 4-5$ ) sowie aus pankreatischen  $\beta$ -Zellen isolierte Inseln von 3, 6 und 12 Monate alten Tieren ( $n = 3$ ). Die Expression ist in allen untersuchten Geweben und Inseln auf das Referenzgen GAPDH normiert worden. Der Wert der 3 Monate alten B6NTac Tiere wurde zur vereinfachten Darstellung 100 % gesetzt.

#### 4.4.1 Genexpressionsanalysen in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen

##### 4.4.1.1 Cytochrom c1-Expression in der Leber

Cytochrom c1 ist Bestandteil des Redox-Zentrums der Cytochrom-c-Reduktase, dem Komplex III der mitochondrialen Atmungskette.

Die relative Expression von Cytochrom c1 auf Ebene der mRNA war im B6NTac Mausstamm im Alter von 3 Monaten am höchsten. Bei den 6 Monate alten Tieren war die Expression signifikant niedriger (3 Monate B6NTac:  $100 \pm 35,40$  % vs. 6 Monate B6NTac:  $39,74 \pm 19,65$  %; Abb. 21). Die 12 Monate alten B6NTac Mäuse zeigten nur einen geringen Wiederanstieg der Expression, sodass auch hier das Cytochrom c1 Level auf mRNA Ebene noch signifikant unter jenem der 3 Monate alten Tiere gleichen Genotyp verblieb (3 Monate B6NTac:  $100 \pm 35,40$  % vs. 12 Monate B6NTac:  $49,58 \pm 21,18$  %; Abb. 21). Im B6mtNOD Stamm lag hingegen die Expression an Cytochrom c1 bei den 3 und 12 Monate alten Tieren auf einem vergleichbaren Niveau, während eine Expressionssteigerung bei den 6 Monate alten Tieren zu verzeichnen war. Insgesamt betrachtet konnte eine höhere Expression bei den 6 Monate und eine geringere Expression bei den 3 Monate alten B6mtNOD Mäusen, im Vergleich zu gleichaltrigen B6NTac Tieren, ermittelt werden. Signifikant fiel dieser Unterschied aber nur zwischen den 3 Monate alten Tieren aus (3 Monate B6NTac:  $100 \pm 35,40$  % vs. 3 Monate B6mtNOD:  $41,23 \pm 25,40$  %; Abb. 21).



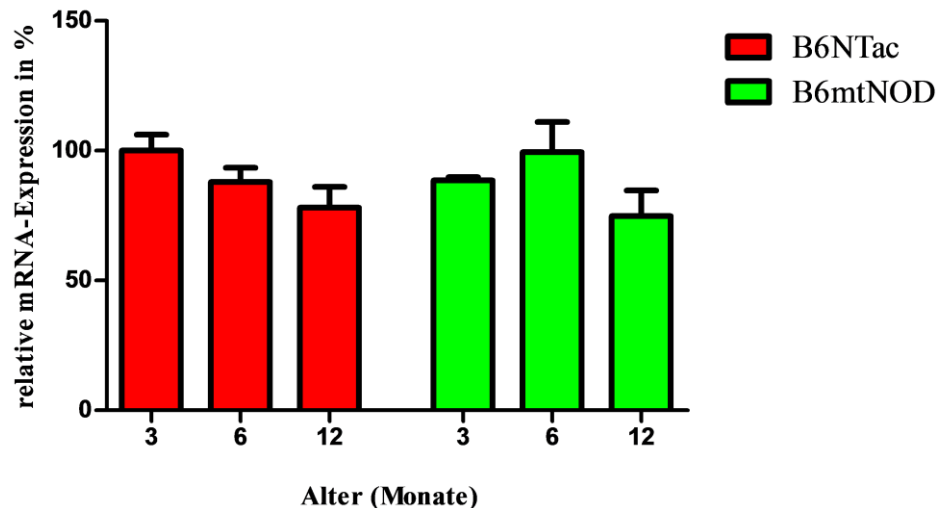
**Abb. 21: Cytochrom c1-Expression in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression von Cytochrom c1 in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*\*p < 0,01; \* p < 0,05 (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4.1.2 Cox6b1-Expression in der Leber

Cox6b1 ist eine der nukleär kodierten Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase, dem Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette.

In der Leber kam es in den B6NTac Tieren mit zunehmendem Alter zu einem kontinuierlichen, jedoch nicht signifikanten Abfall der relativen Cox6b1-Expression auf Ebene der mRNA (Abb. 22). Im B6mtNOD Stamm zeigte sich hingegen ein geringer Anstieg bei den 6 Monate alten Tieren gefolgt von einer Abnahme bei den 12 Monate alten Tieren. Damit war die Expression der 12 Monate alten B6mtNOD Mäuse niedriger als in 3 Monate alten Tieren gleichen Genotyps (Abb. 22). Signifikante Unterschiede zwischen den B6NTac und B6mtNOD Tieren konnten nicht ermittelt werden.



**Abb. 22: Cox6b1-Expression in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

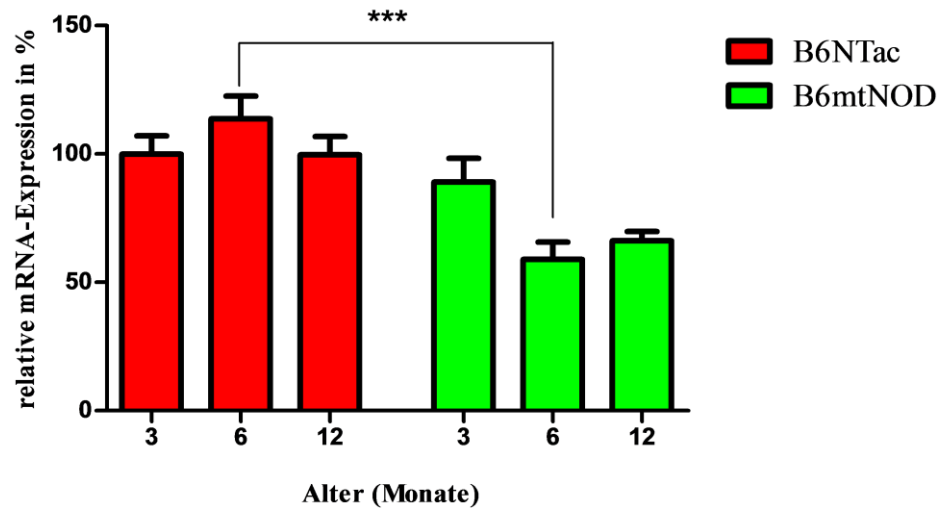
Relative mRNA-Expression der Cox6b1-Untereinheit in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

### 4.4.1.3 UCP2-Expression in der Leber

Das Uncoupling Protein 2 (UCP2) wird in den meisten Geweben exprimiert, darunter Muskulatur und Fettgewebe (Scarpace, P.J. et al. 1998). Es ist ein in Mitochondrien lokalisiertes Protein, das durch ein Protonenleck den Aufbau des für die ATP-Synthese benötigten Membranpotentials verhindert. Dadurch kommt es zu einer Trennung der oxidativen Phosphorylierung von der ATP-Synthese, was zu einer Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration führt. Es konnte gezeigt werden, dass UCP2 u.a. das Überleben von  $\beta$ -Zellen fördert und Gewebe wie Leber, Endothel und Neuronen vor oxidativem Stress schützt (Azzu, V. & Brand, M. D. 2009). Darüber hinaus geht man davon aus, dass UCP2 eine zytoprotektive Rolle einnimmt, indem es mitochondriale Biogene stimuliert und der Apoptose vorbeugt. Des Weiteren scheint UCP2 in der Kontrolle der von den Mitochondrien generierten ROS eine wichtige Rolle einzunehmen (Azzu, V. & Brand, M. D. 2009).

In der Leber des B6NTac Kontrollstammes blieb die Expression an UCP2 mRNA bei den 3 und 12 Monate alten Mäusen vergleichbar. Lediglich in den 6 Monate alten Tieren wurde eine höhere Expression ermittelt (Abb. 23). Bei den B6mtNOD Mäusen zeigte sich die höchste Expression bei den 3 Monate alten Tieren. In 6 und 12 Monate alte B6mtNOD Tieren fand sich eine deutlich geringere Expression (Abb. 23). Insgesamt lag die UCP2-Expression im B6NTac Stamm über jener der B6mtNOD Mäuse im Alter von

6 und 12 Monaten. Signifikant fiel dieser Unterschied nur zwischen den 6 Monate alten Tieren aus (6 Monate B6NTac:  $113,63 \pm 17,63$  % vs. 6 Monate B6mtNOD:  $58,99 \pm 25,58$  %; Abb. 23).



**Abb. 23: UCP2-Expression in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

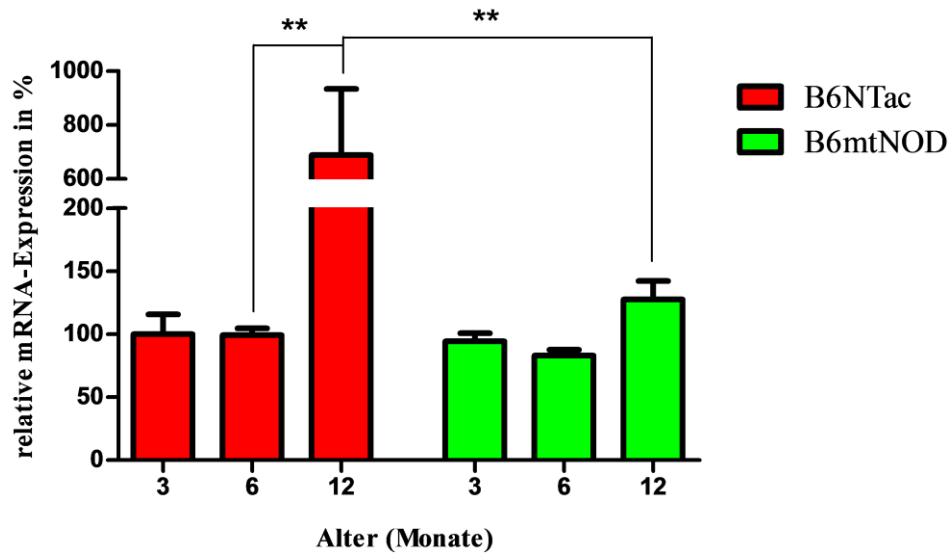
Relative mRNA-Expression von UCP2 in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*\*\*p < 0,001 (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4.1.4 SOD1-Expression in der Leber

Die SOD1 katalysiert die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2$  aus Superoxid-Radikalen. Sie kommt vorwiegend im Zytosol vor.

Die Expression der SOD1 auf Ebene der mRNA war in beiden Mausstämmen im Alter von 3 und 6 Monaten vergleichbar (Abb. 24). Beide Mausstämme zeigten im Alter von 12 Monaten einen Anstieg der SOD1-Expression, jedoch fiel dieser nur in der B6NTac Gruppe signifikant aus gegenüber den 6 Monate alten Tieren gleichen Genotyps (6 Monate B6NTac:  $99,25 \pm 14,67$  % vs. 12 Monate B6NTac:  $688,49 \pm 94,25$  %; Abb. 24) bzw. den 12 Monate alten B6mtNOD Tieren (12 Monate B6NTac:  $688,49 \pm 94,25$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $127,60 \pm 30,15$  %; Abb. 24).





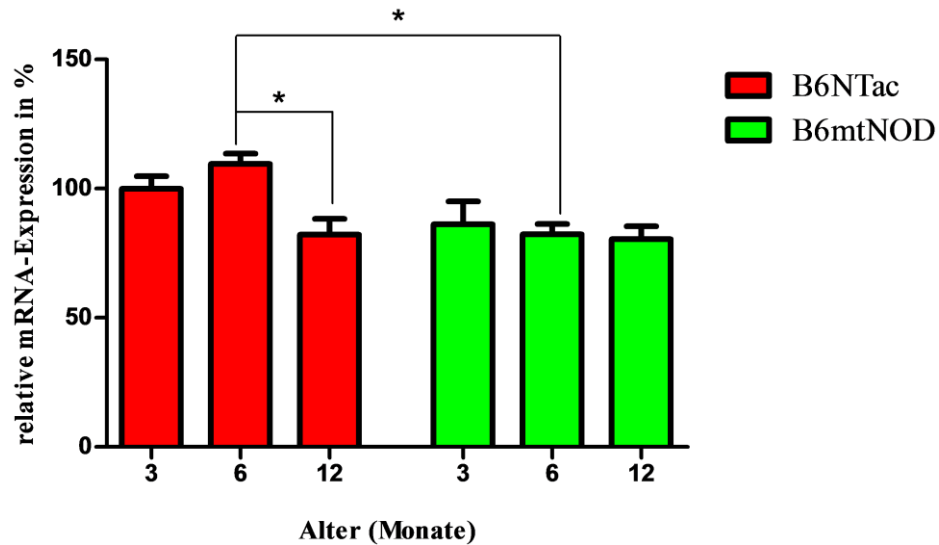
**Abb. 24: SOD1-Expression in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der SOD1 in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*\* $p < 0,01$  (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4.1.5 SOD2-Expression in der Leber

Hauptlokalisationsort der SOD2 ist die mitochondriale Matrix, wo sie die Bildung von  $H_2O_2$  und  $O_2$  aus Superoxid-Radikalen katalysiert, die während der Atmungskette gebildet werden.

Die mRNA-Expression der SOD2 in der Leber war in 6 Monate alten B6NTac Mäusen im Vergleich zu den 3 Monate alten Tieren leicht erhöht. In 12 Monate alten B6NTac Tieren kam es hingegen zu einer signifikant niedrigeren Expression gegenüber den 6 Monate alten Tieren gleichen Genotyps (6 Monate B6NTac:  $109,51 \pm 7,37$  % vs. 12 Monate B6NTac:  $82,13 \pm 14,92$  %; Abb. 25). Bei den B6mtNOD Tieren war die Expression im Alter von 3, 6 und 12 Monaten auf einem vergleichbaren Niveau (Abb. 25). Insgesamt betrachtet lag die SOD2-Expression der B6NTac Mäuse zu allen Alterszeitpunkten über jener der B6mtNOD Mäuse. Signifikant war dieser Unterschied bei den 6 Monate alten Tieren (6 Monate B6NTac:  $109,51 \pm 7,37$  % vs. 6 Monate B6mtNOD:  $82,28 \pm 10,90$  %; Abb. 25).



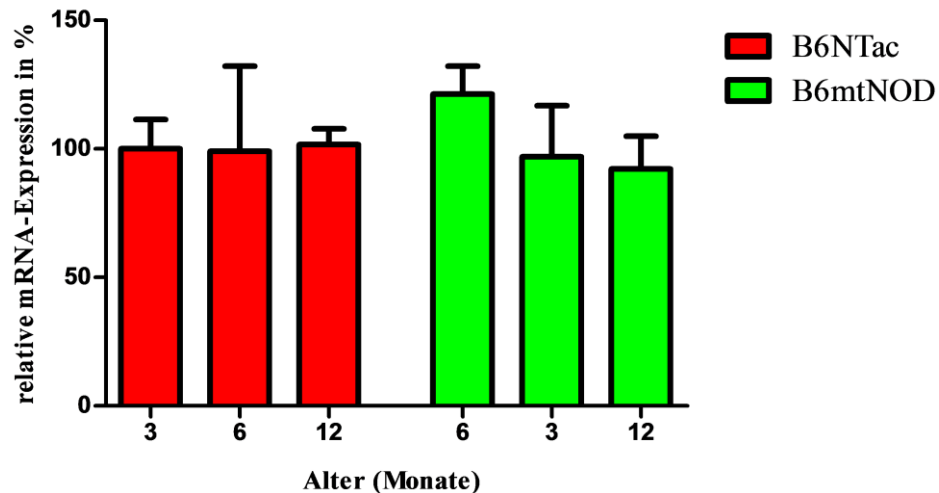
**Abb. 25: SOD2-Expression in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der SOD2 in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \* $p < 0,05$  (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test).

### 4.4.1.6 Katalase-Expression in der Leber

Die Katalase ist ein intrazelluläres Enzym, welches die Umwandlung von  $2\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{O}_2$  und  $2\text{H}_2\text{O}$  katalysiert.

Die Expression der Katalase auf Ebene der mRNA blieb bei den B6NTac Tieren zu allen Alterszeitpunkten auf einem vergleichbaren Niveau (Abb. 26). Bei den B6mtNOD Mäusen kam es hingegen mit steigendem Alter zu einer kontinuierlichen Abnahme der Katalase-Expression (Abb. 26). Insgesamt betrachtet lag die Expression bei den 3 Monate alten B6mtNOD Tieren über derjenigen der gleichaltrigen B6NTac Mäuse. In der Gruppe der 6 und 12 Monate alten Tiere waren die Werte in etwa vergleichbar. Zusammenfassend konnten weder innerhalb noch zwischen den beiden Mausstämmen signifikante Unterschiede ermittelt werden.



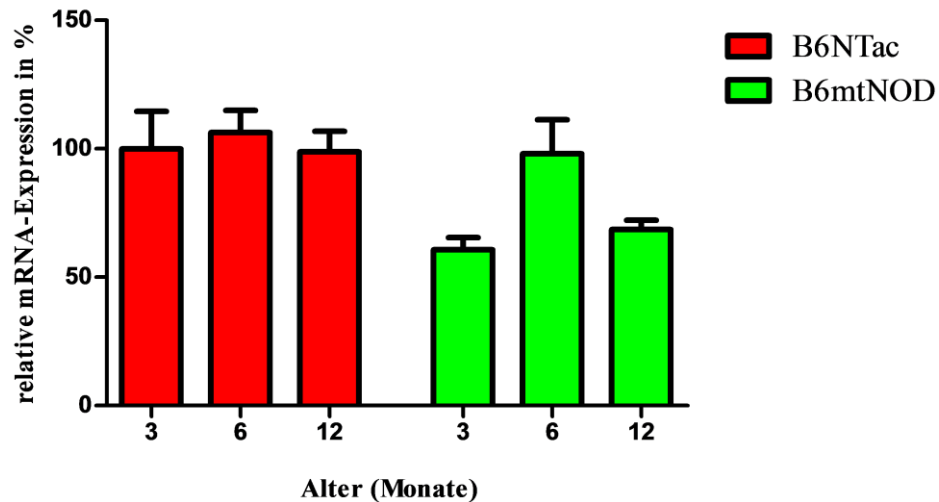
**Abb. 26: Katalase-Expression in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der Katalase in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

### 4.4.1.7 Tfam-Expression in der Leber

Der Transkriptionsfaktor A (Tfam) wird, über NRF-1 geregelt, nukleär codiert. Er ist essentiell für die Replikation des mitochondrialen Genoms und in der Lage die mitochondriale Transkription zu aktivieren (Klinge, C.M. 2008; Kang, C. & Li J.L. 2012). Humanes und Mäuse Tfam-Protein ähneln sich bis zu 78 % (Kaufmann, B.A. et al. 2007). Tfam kann an Regionen der mtDNA binden, die oberhalb der Promotoren liegen. Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen der Tfam-Expression und der Anzahl an mtDNA gefunden werden. Des Weiteren scheint Tfam bedeutend für die Struktur der mtDNA zu sein, sodass man vermutet, dass sich beide Moleküle gegenseitig stabilisieren. In Studien konnte gezeigt werden, dass es bei Mutationen von Tfam zu einer Reduktion der mtDNA Kopienanzahl kommt, die mit einer Instabilität der mtDNA einhergeht (Uchiumi, T. & Kang, D. 2011).

Bei den B6NTac Tieren war die Expression von Tfam auf mRNA Ebene zu allen Alterszeitpunkten in etwa auf einem vergleichbaren Niveau (Abb. 27). Im B6mtNOD Stamm kam es zu einem nicht signifikanten Anstieg der Expression bei den 6 und einer erneuten Abnahme bei den 12 Monate alten Tieren, deren Expression aber noch gering über jener der 3 Monate alten Tiere verblieb (Abb. 27). Im Vergleich der beiden Mausstämmen miteinander konnte zu allen drei untersuchten Alterszeitpunkten eine nicht signifikant höhere Expression von Tfam bei den B6NTac Mäusen ermittelt werden.



**Abb. 27: Tfam-Expression in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

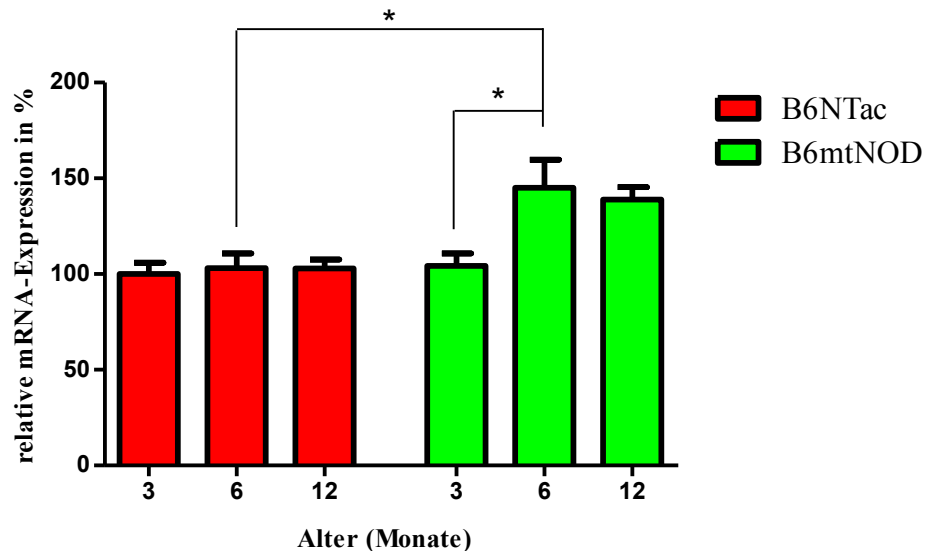
Relative mRNA-Expression der Tfam in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

### 4.4.1.8 Pyruvatcarboxylase-Expression in der Leber

Die Pyruvatcarboxylase ist ein in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes anaplerotisches Enzym, dass die ATP-abhängige Addition von Kohlenstoffdioxid an Pyruvat und damit die Bildung von Oxalacetat katalysiert (Ostergaard, E. et al. 2013). Oxalacetat wird daraufhin durch die Phosphoenol-Pyruvatcarboxylase in Phosphoenolpyruvat umgewandelt oder in den Zitratzyklus eingeschleust (Ostergaard, E. et al. 2013). Damit spielt die Pyruvatcarboxylase zum einen eine wichtige Rolle in der Glukoneogenese, aber auch in der Produktion von Neurotransmittern sowie als Lieferant für zytoplasmatisches NADPH im Fettgewebe und den  $\beta$ -Zellen (Ostergaard, E. et al. 2013; Adina-Zada, A. et al. 2012). Eine Dysregulation der Expression an Pyruvatcarboxylase in Leber, Fettgewebe oder den Langerhans'schen Inseln ist mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert (Thonpho, A. et al. 2013)

Im Kontrollstamm B6NTac verblieb die Expression der Pyruvatcarboxylase auf Ebene der mRNA bei allen drei untersuchten Altersklassen auf einem ähnlichen Niveau (Abb. 28). Größere Varianz zeigte der B6mtNOD Stamm. Hierbei kam es von den 3 auf die 6 Monate alten Tiere zu einem signifikanten Anstieg der Expression (3 Monate B6mtNOD:  $104 \pm 13,71$  %; vs. 6 Monate B6mtNOD:  $145,11 \pm 22,45$  %; Abb. 28). Die Werte blieben bei den 12 Monate alten B6mtNOD Mäusen vergleichbar hoch. Insgesamt betrachtet lag im Alter von 6 und 12 Monaten die Expression der Pyruvatcarboxylase der B6mtNOD

Mäuse über der des B6NTac Kontrollstamms. Signifikant fiel dieser Unterschied nur zwischen den 6 Monate alten Tieren aus (6 Monate B6NTac:  $103,01 \pm 16,93$  % vs. 6 Monate B6mtNOD:  $145,11 \pm 22,45$  %; Abb. 28).



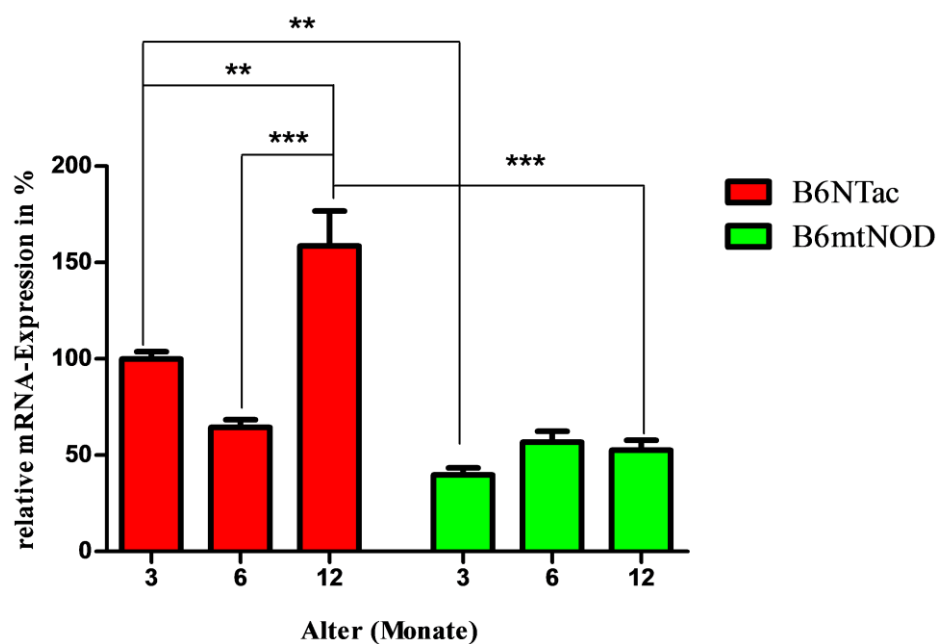
**Abb. 28: Pyruvatcarboxylase-Expression in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der Pyruvatcarboxylase in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*  $p < 0,05$  (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test).

### 4.4.1.9 COX1- Expression in der Leber

Die Cyclooxygenase 1 (COX1) ist ein im gesamten Organismus vorkommendes Enzym, dass die Oxidation von Arachidonsäure zu Prostaglandin  $H_2$  (PGH<sub>2</sub>) katalysiert (Rassow, J. et al., Kapitel 21.1, 2006). Prostaglandine selbst nehmen neben einer zentralen Rolle in inflammatorischen Prozessen, auch eine wichtige Funktion in der Regulation anderer physiologischer Zellantworten ein (Dubois, R.N. et al. 1998). Für die von COX1 bereitgestellten Prostaglandine wird eine Beteiligung am Housekeeping-Effekt wie auch an der homeostatischen Regulation vermutet (Dubois, R.N. et al. 1998). Weiterhin ergaben Untersuchungen an Mäusen, dass die über COX1 gebildeten Prostaglandine für das Überleben des Fetus mit von Bedeutung sind (Vane, J.R. et al. 1998). In Bezug auf Diabetes mellitus konnten in diabetischen Ratten organspezifische Veränderungen des COX1-mRNA-Levels mit veränderten intrazellulärem Prostanoid Metabolismus beobachtet werden, der in der Pathogenese diabetischer Komplikationen mit involviert ist (Fang, C. et al. 1997).

Die COX1-Expression auf mRNA Ebene nahm bei den B6NTac Tieren von den 3 auf die 6 Monate alten Tiere ab, stieg aber bei den 12 Monate alten Tieren signifikant wieder an (6 Monate B6NTac:  $64,39 \pm 14,14$  % vs. 12 Monate B6NTac:  $158,58 \pm 25,67$  %; Abb. 29). Insgesamt ergab sich eine signifikant höhere Expression der 12 Monate alten B6NTac Tiere gegenüber den 3 Monate alten Tieren gleichen Genotyps (3 Monate B6NTac  $100 \pm 7,43$  % vs. 12 Monate B6NTac  $158,58 \pm 25,67$  %; Abb. 29). Innerhalb des B6mtNOD Stamms zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede. Die Expression der COX1 stieg von den 3 auf die 6 Monate alten B6mtNOD Tiere tendenziell an (Abb. 29). Im Vergleich der beiden Genotypen miteinander lag die Expression an COX1 auf mRNA Ebene bei den B6NTac Tieren immer über derjenigen der B6mtNOD Tiere. Dieser Unterschied fiel bei den 3 und 12 Monate alten Tieren signifikant aus (3 Monate B6NTac:  $100 \pm 7,43$  % vs. 3 Monate B6mtNOD:  $39,80 \pm 20,10$  %; 12 Monate B6NTac:  $158,58 \pm 25,67$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $52,51 \pm 22,25$  %; Abb. 29).



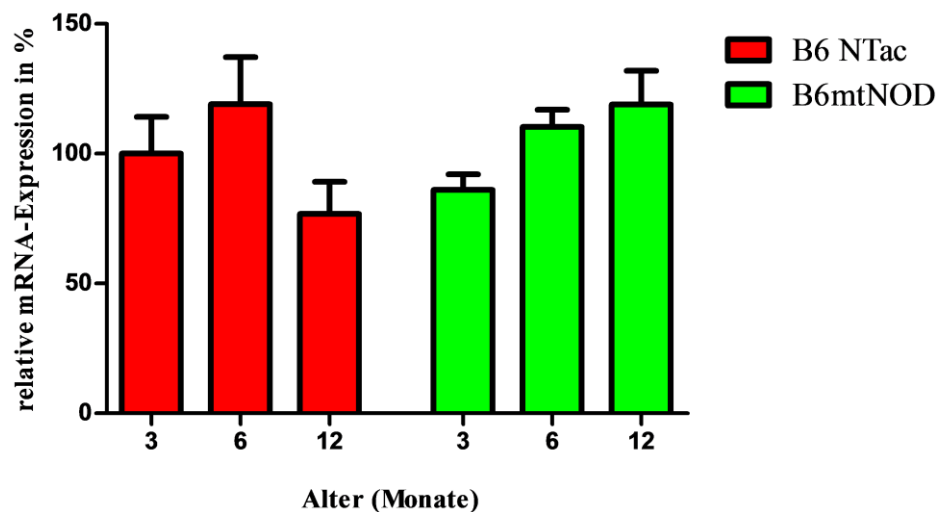
**Abb. 29: COX1-Expression in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der COX1 in der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01 (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4.2 Genexpressionsanalysen im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen

#### 4.4.2.1 Cytochrom c1-Expression im Gehirn

Die Cytochrom c1-Expression auf Ebene der mRNA stieg bei den B6NTac Tieren von den 3 auf die 6 Monate alten Mäuse an und fiel im Alter von 12 Monaten wieder ab (Abb. 30). Im Gegensatz dazu zeigte sich im B6mtNOD Mausstamm ein kontinuierlicher Anstieg der Cytochrom c1-Genexpression (Abb. 30). Signifikant waren die dargestellten Unterschiede allerdings nicht.

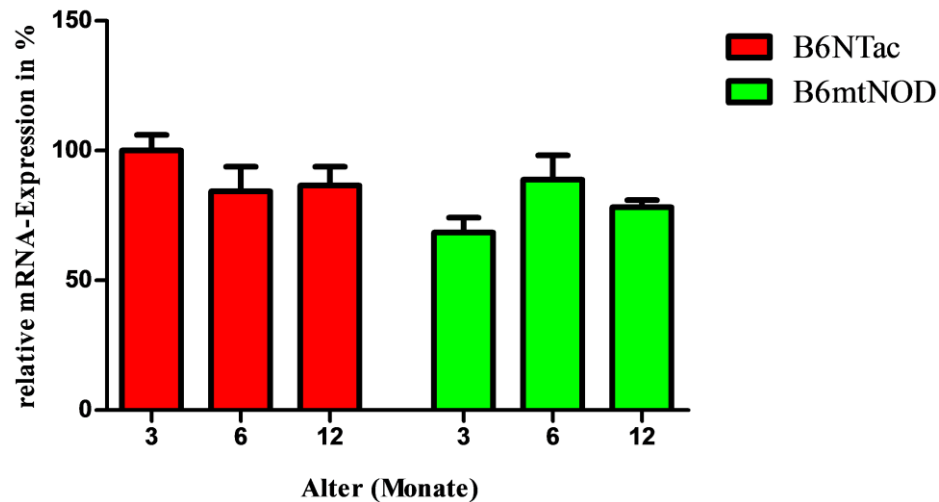


**Abb. 30: Cytochrom c1-Expression im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression von Cytochrom c1 in % im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

#### 4.4.2.2 Cox6b1-Expression im Gehirn

Im Gehirn der B6NTac Tiere lag die höchste relative mRNA-Expression an Cox6b1 bei den 3 Monate alten Tieren vor. Die Werte der 6 und 12 Monate alten Mäuse lagen auf einem vergleichbaren Niveau tendenziell niedriger (Abb. 31). Bei den B6mtNOD Tieren kam es hingegen zu einem Anstieg der Expression bei den 6 Monate und einer Abnahme bei den 12 Monate alten Tieren (Abb. 31). Insgesamt konnten aber keine signifikanten Unterschiede innerhalb und zwischen den beiden Mausstämmen ermittelt werden.

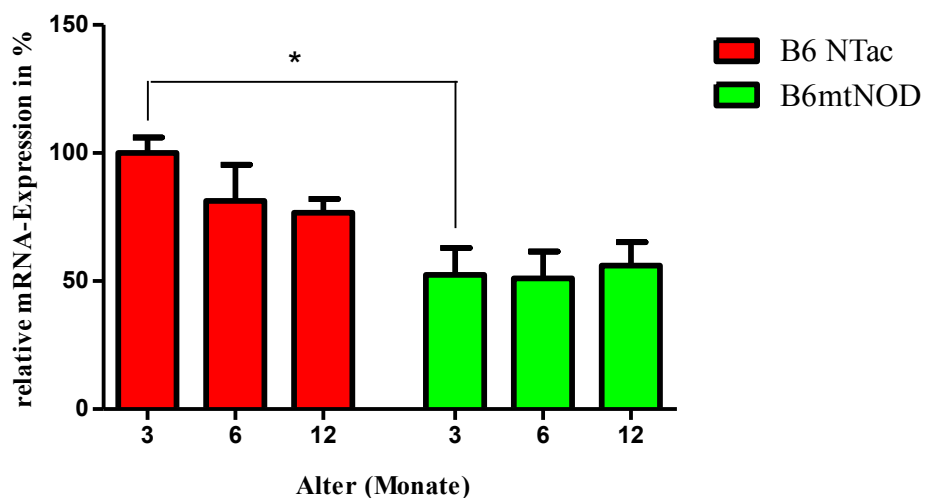


**Abb. 31: Cox6b1-Expression im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der Cox6b1-Untereinheit im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

### 4.4.2.3 UCP2-Expression im Gehirn

Die Expression an UCP2 mRNA fiel bei den B6NTac Tieren mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab (Abb. 32). Bei den B6mtNOD Mäusen verblieb sie zu allen Alterszeitpunkten auf einem vergleichbaren Niveau (Abb. 32). Die UCP2-Expression der B6NTac Tiere lag über jener der B6mtNOD Tiere vergleichbaren Alters. Signifikant war dieser Unterschied zwischen den 3 Monate alten Tieren (3 Monate B6NTac:  $100 \pm 13,60$  % vs. 3 Monate B6mtNOD:  $52,42 \pm 44,81$  %; Abb. 32).



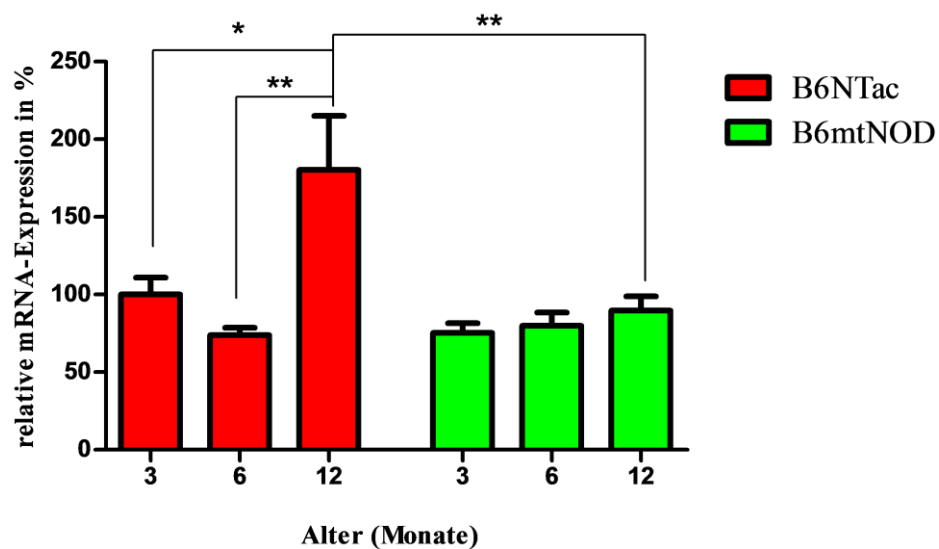
**Abb. 32: UCP2-Expression im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression von UCP2 im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \* $p < 0,05$  (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)



### 4.4.2.4 SOD1-Expression im Gehirn

Im Gehirn der B6NTac Mäuse kam es von den 3 auf die 6 Monate alten Tiere zunächst zu einer Abnahme der SOD1-Expression auf mRNA Ebene. Es folgte ein signifikanter Anstieg der Expression von den 6 auf die 12 Monate alten Tiere (6 Monate B6NTac:  $73,85 \pm 14,54$  %; vs. 12 Monate B6NTac:  $180,22 \pm 43,29$  %; Abb. 33). Insgesamt fiel der Anstieg der SOD1-Expression von den 3 auf die 12 Monate alten Tiere in der B6NTac Gruppe ebenfalls signifikant aus (3 Monate B6NTac:  $100 \pm 21,96$  % vs. 12 Monate B6NTac:  $180,22 \pm 43,29$  %; Abb. 33). Bei den B6mtNOD Mäusen kam es tendenziell zu einem kontinuierlichen, jedoch nicht signifikanten Anstieg der Expression mit zunehmendem Alter (Abb. 33). Die Expression der 12 Monate alten B6mtNOD Mäuse lag signifikant unter derjenigen der B6NTac Tiere gleichen Alters (12 Monate B6NTac:  $180,22 \pm 43,29$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $89,76 \pm 22,65$  %; Abb. 33).



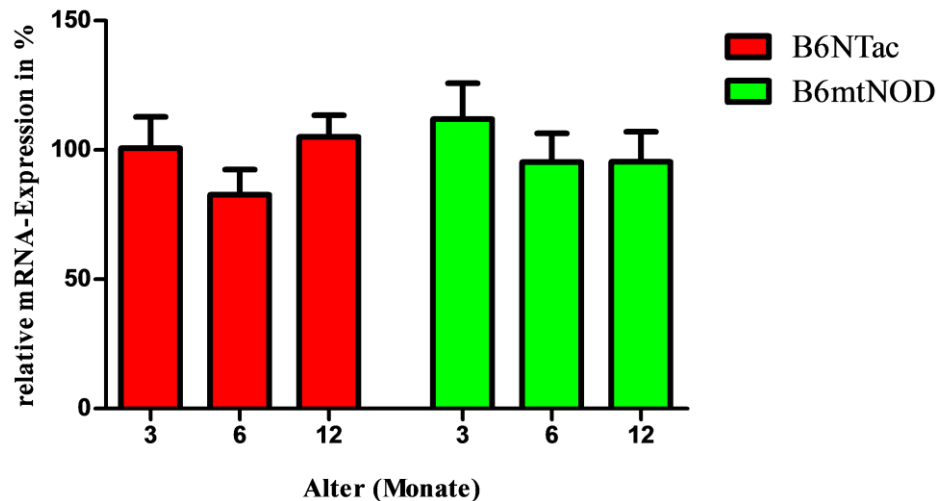
**Abb. 33: SOD1-Expression im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der SOD1 im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4.2.5 SOD2-Expression im Gehirn

Die Expression der SOD2 auf mRNA Ebene war bei den 3 und 12 Monate alten B6NTac Mäusen vergleichbar, bei den 6 Monate alten Tieren tendenziell niedriger (Abb. 34). Bei den B6mtNOD Mäusen lagen die Werte der Genexpression der 6 und 12 Monate alten Tiere auf einem ähnlichen Niveau, während die Expression bei den 3 Monate alten Tieren

tendenziell höher ausfiel (Abb. 34). Signifikante Unterschiede konnten allerdings nicht ermittelt werden.

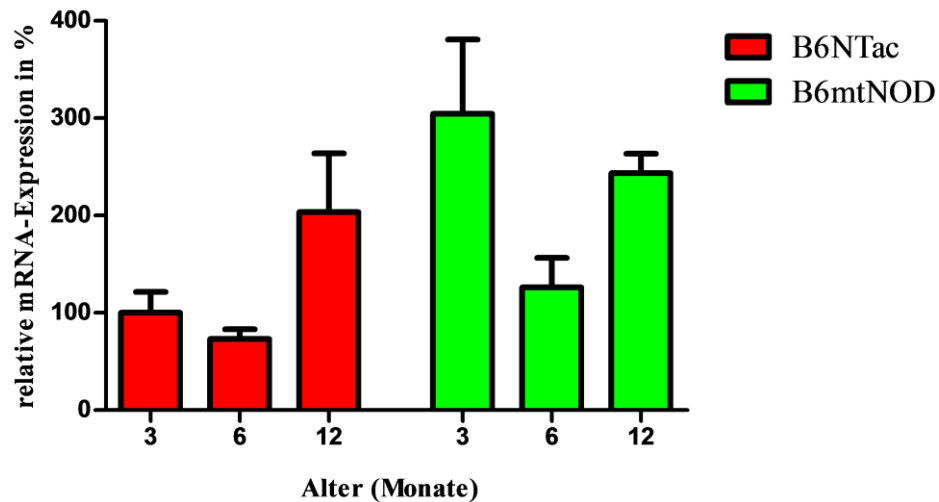


**Abb. 34: SOD2-Expression im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression von SOD2 im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

### 4.4.2.6 Katalase-Expression im Gehirn

Bei den B6NTac Mäusen sank die Expression der Katalase auf Ebene der mRNA im Alter von 6 Monaten zunächst ab, stieg aber im Alter von 12 Monaten deutlich wieder an (Abb. 35). Ein ähnlicher Verlauf war auch bei den B6mtNOD Mäusen zu beobachten. Das höchste Expressionsniveau war hier jedoch im Alter von 3 Monaten zu finden (Abb. 35). Insgesamt betrachtet lag die Katalase-Expression der B6mtNOD über derjenigen der B6NTac Tiere gleichen Alters, jedoch ohne signifikanten Unterschied.

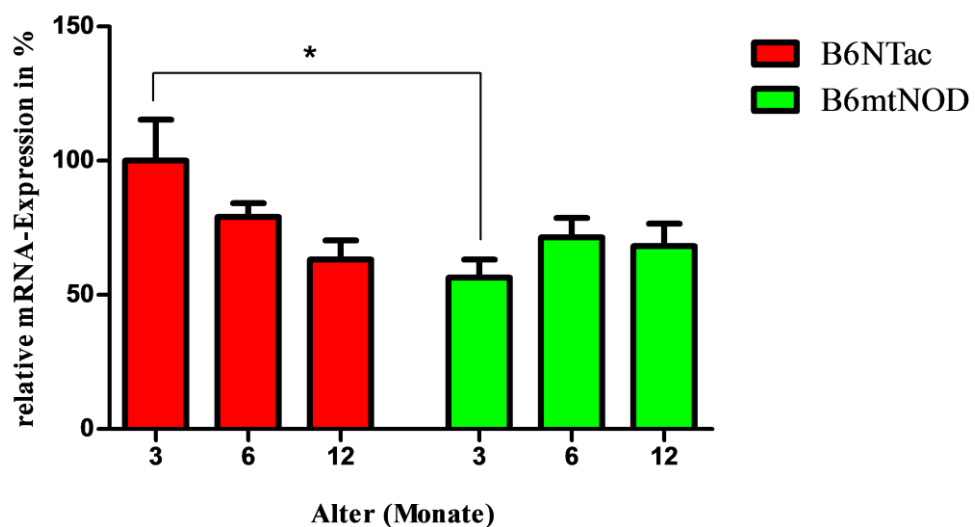


**Abb. 35: Katalase-Expression im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der Katalase im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

### 4.4.2.7 Tfam-Expression im Gehirn

Im Gehirn der B6NTac Gruppe kam es von den 3 auf die 12 Monate alten Tiere zu einer kontinuierlichen Abnahme der Tfam-Expression auf Ebene der mRNA (Abb. 36). Bei den B6mtNOD Mäusen stieg die Expression von den 3 auf die 12 Monate alten Tiere leicht an (Abb. 36). Bei den 3 Monate alten Tieren kam es zu einer signifikant höheren Expression in den B6NTac Mäusen gegenüber den B6mtNOD Tieren gleichen Alters (3 Monate B6NTac:  $100 \pm 34,15$  % vs. 3 Monate B6mtNOD:  $56,47 \pm 26,44$  %; Abb. 36)

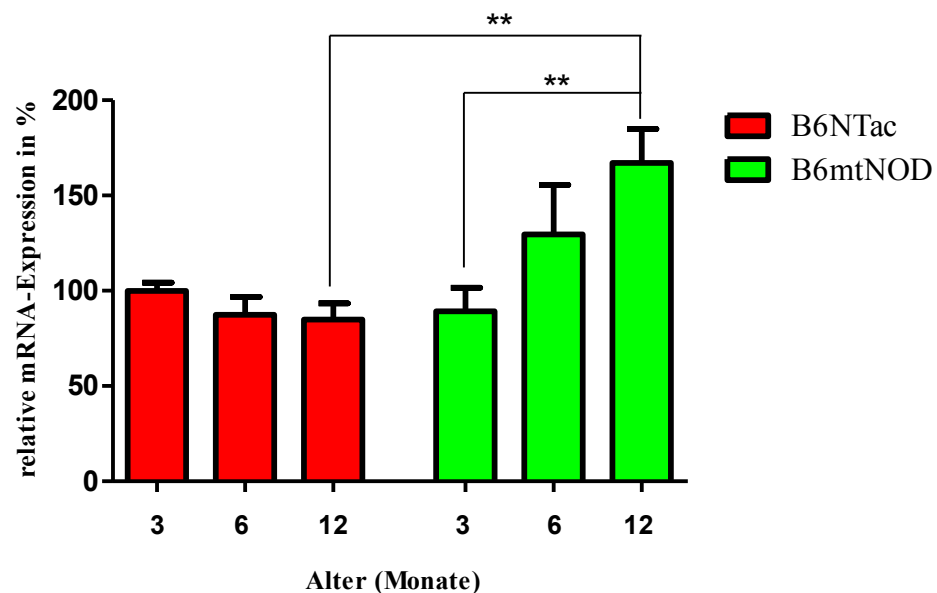


**Abb. 36: Tfam-Expression im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression von Tfam im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*p < 0,05 (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4.2.8 Pyruvatcarboxylase-Expression im Gehirn

Die Pyruvatcarboxylase-Expression auf mRNA Ebene im Gehirn der B6NTac Tiere nahm mit steigendem Alter tendenziell ab (Abb. 37). Bei den B6mtNOD Mäuse kam es hingegen zu einem signifikanten Anstieg der Expression von den 3 auf die 12 Monate alten Tiere (3 Monate B6mtNOD:  $89,20 \pm 31,11$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $167,11 \pm 23,90$  %; Abb. 37). Der Vergleich der beiden Mausstämme zeigt bei den 12 Monate alten Mäusen eine signifikant höhere Expression in den B6mtNOD Tieren gegenüber den B6NTac Mäusen gleichen Alters (12 Monate B6NTac:  $84,95 \pm 22,13$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $167,11 \pm 23,90$  %; Abb. 37).



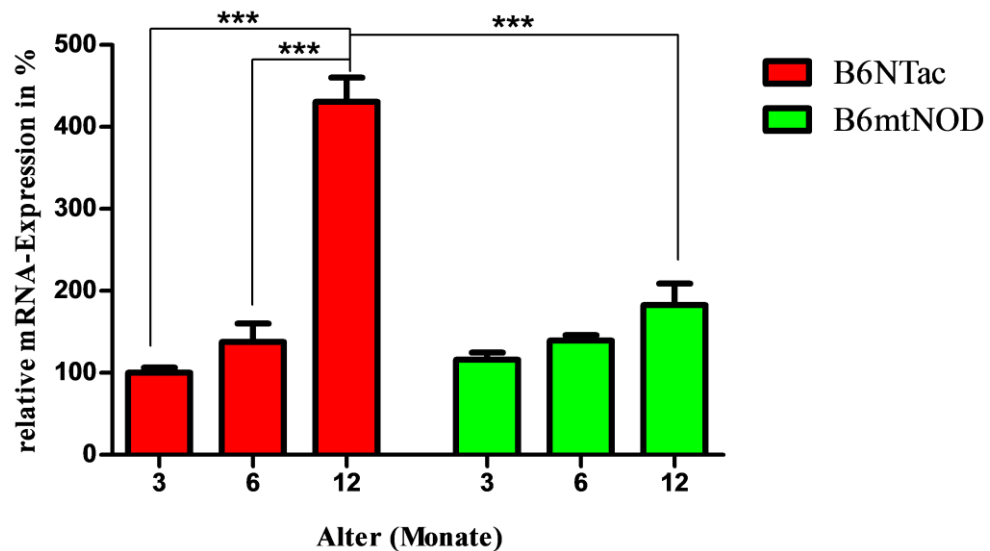
**Abb. 37: Pyruvatcarboxylase-Expression im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der Pyruvatcarboxylase im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*\* $p < 0,01$  (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4.2.9 COX1-Expression im Gehirn

Im Gehirn der B6NTac Mäuse kam es mit steigendem Alter zu einem Anstieg der Expression an COX1 auf Ebene der mRNA. Dabei fielen sowohl der Anstieg von den 3 auf die 12, wie auch von den 6 auf die 12 Monate alten Tiere signifikant aus (3Monate B6NTac:  $100 \pm 13,30$  % vs. 12 Monate B6NTac:  $430,43 \pm 13,79$  %; 6 Monate B6NTac:  $137,75 \pm 36,74$  % vs. 12 Monate B6NTac:  $430,43 \pm 13,79$  %; Abb. 38). Bei den B6mtNOD Mäusen konnte von den 3 auf die 12 Monate alten Tiere eine kontinuierliche, jedoch nicht signifikante Steigerung in der COX1-Expression ermittelt werden (Abb. 38).

Zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen kam es bei den 12 Monate alten Tieren. Hier lag die COX1-Expression der B6NTac Tiere signifikant über derjenigen der B6mtNOD Mäuse (12 Monate B6NTac:  $430,43 \pm 13,79$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $182,60 \pm 32,23$  %; Abb. 38).



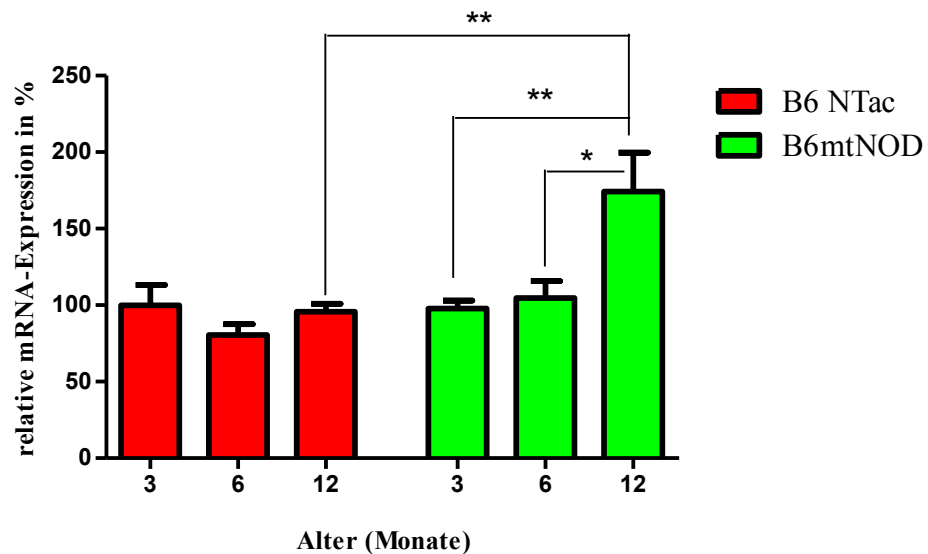
**Abb. 38: COX1-Expression im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD**

Relative mRNA-Expression der COX1 im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*\*\* $p < 0,001$  (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4.3 Genexpressionsanalysen im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen

#### 4.4.3.1 Cytochrom c1-Expression im Muskel

Bei den B6NTac Mäusen lag die Expression der Cytochrom c1 mRNA bei den 3 und 12 Monate alten Tieren auf einem ähnlichen Niveau, während sich jene der 6 Monate alten Tiere gering darunter befand (Abb. 39). Im Gegensatz dazu kam es im B6mtNOD Stamm zu einem signifikanten Anstieg der Expression von den 3 Monate auf die 12 Monate alten Mäuse (3 Monate B6mtNOD:  $97,76 \pm 12,14$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $174,32 \pm 32,50$  %; Abb. 39). Signifikant höher war auch die Cytochrom c1-Expression der 12 Monate alten B6mtNOD Mäuse gegenüber den 6 Monate alten B6mtNOD Tieren sowie den B6NTac Tieren gleichen Alters (12 Monate B6NTac:  $95,65 \pm 12,42$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $174,32 \pm 32,50$  %; 6 Monate B6mtNOD:  $104,66 \pm 23,46$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $174,32 \pm 32,50$  %; Abb. 39).

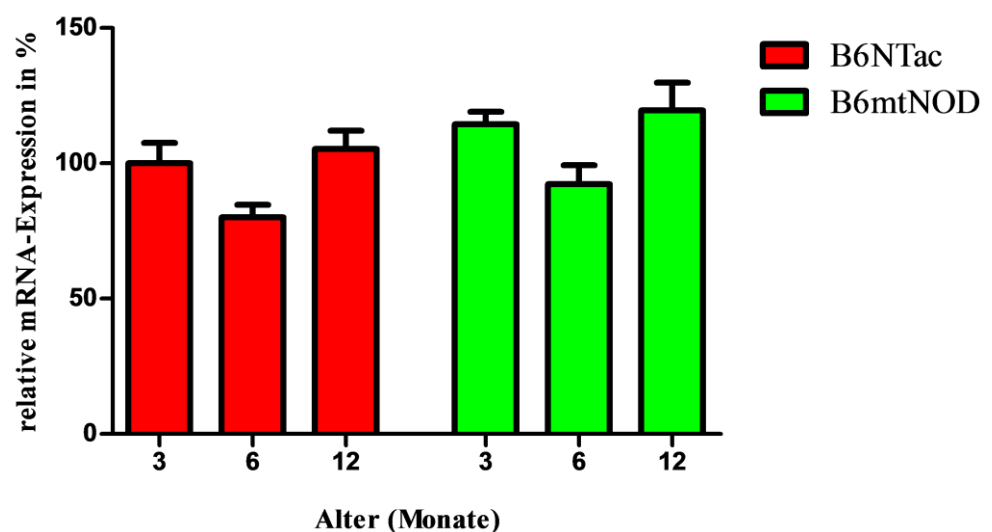


**Abb. 39: Cytochrom c 1-Expression im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression von Cytochrom c1 in % im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4.3.2 Cox6b1-Expression im Muskel

Die relative Expression der Cox6b1-Untereinheit auf mRNA Ebene lag bei den 3 und 12 Monate alten B6NTac Tieren auf einem vergleichbaren Niveau, während sie bei den 6 Monate alten Mäusen niedriger war (Abb. 40). Die B6mtNOD Tiere zeigten einen ähnlichen Verlauf. Die Expression in der B6mtNOD Gruppe lag tendenziell über jener der B6NTac Mäuse vergleichbaren Alters.

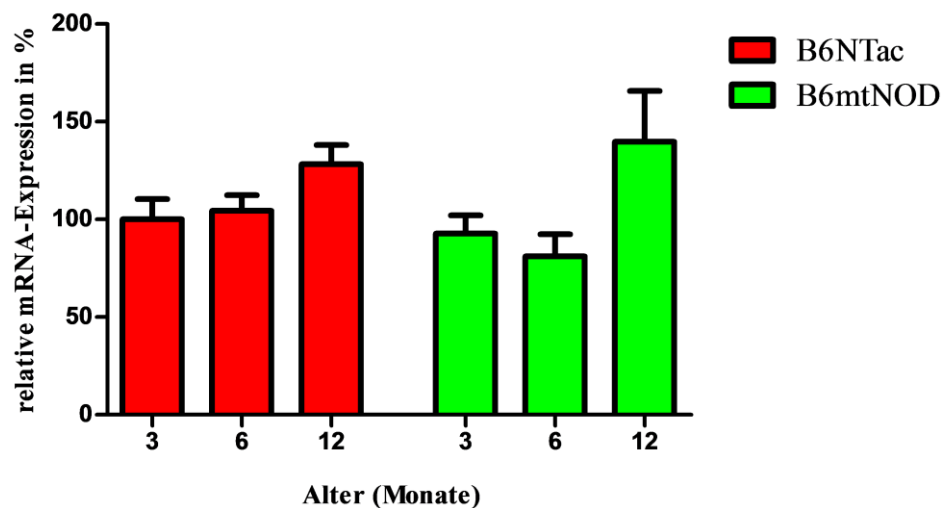


**Abb. 40: Cox6b1-Expression im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der Cox6b1-Untereinheit im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

### 4.4.3.3 UCP2-Expression im Muskel

Die Expression von UCP2 auf Ebene der mRNA lag bei 3 und 6 Monate alten B6NTac Tieren auf einem ähnlichen Niveau und stieg bei den 12 Monate alten Tieren an (Abb. 41). Bei den B6mtNOD Mäusen kam es zu einem geringen Abfall der Expression bei den 6 Monate alten Tieren. Ein Anstieg der UCP2-Expression bei den 12 Monate alten Tieren konnte jedoch auch im B6mtNOD Stamm beobachtet werden (Abb. 41). Signifikante Unterschiede zwischen und innerhalb der B6NTac und B6mtNOD Mäuse zeigten sich nicht.

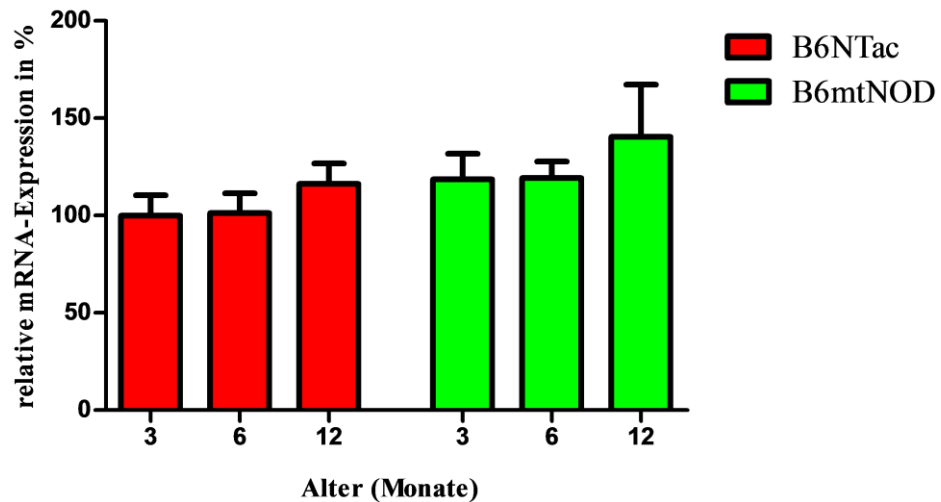


**Abb. 41: UCP2-Expression im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression von UCP2 im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

### 4.4.3.4 SOD1-Expression im Muskel

Die SOD1-Expression auf mRNA Ebene lag bei den 3 und 6 Monate alten B6NTac Tieren auf einem vergleichbaren Niveau und stieg bei den 12 Monate alten Tieren an (Abb. 42). Einen ähnlichen Verlauf zeigte sich auch bei den B6mtNOD Tieren, in der die Expression gegenüber den B6NTac Mäusen jedoch zu allen Alterszeitpunkten tendenziell höher ausfiel (Abb. 42).

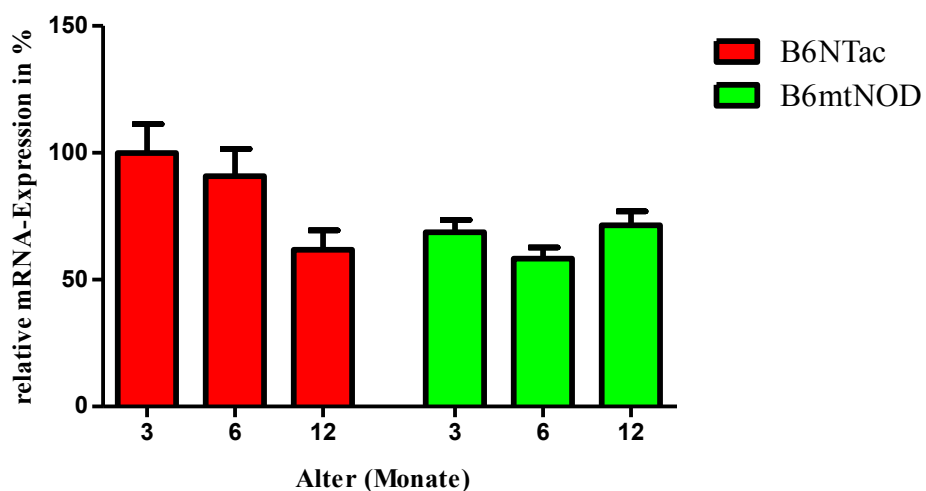


**Abb. 42: SOD1-Expression im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der SOD1 im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

### 4.4.3.5 SOD2-Expression im Muskel

Die SOD2-Expression auf mRNA Ebene im Muskel der B6NTac Tiere nahm mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab (Abb. 43). Bei den B6mtNOD Mäusen lag die Expression auf vergleichbarem Niveau und zu den Alterszeitpunkten von 3 und 6 Monaten unter dem der B6NTac Tiere. Signifikant waren diese Unterschiede allerdings nicht.



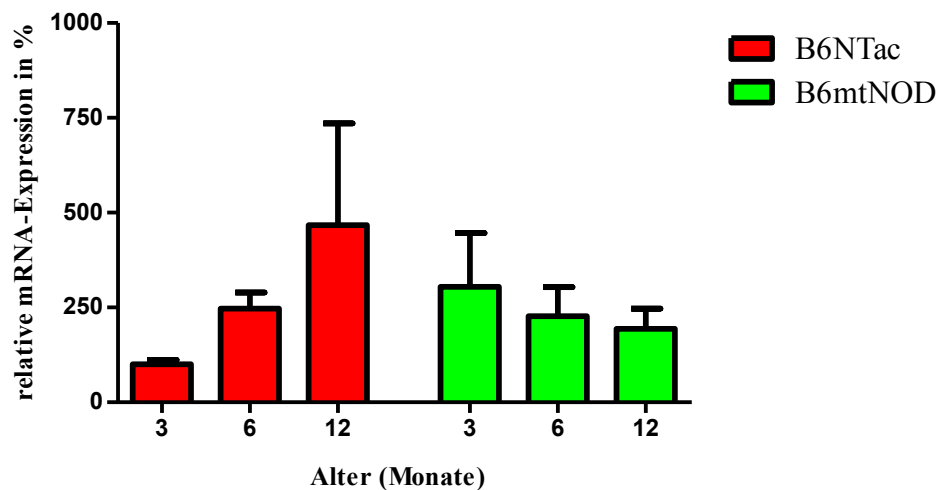
**Abb. 43: SOD2-Expression im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der SOD2 im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.



### 4.4.3.6 Katalase-Expression im Muskel

Die Expression der Katalase auf mRNA Ebene verzeichnete in der B6NTac Gruppe altersabhängig einen deutlichen Anstieg, während sie bei den B6mtNOD Tieren kontinuierlich abfiel (Abb. 44). Signifikant waren die Unterschiede allerdings nicht.

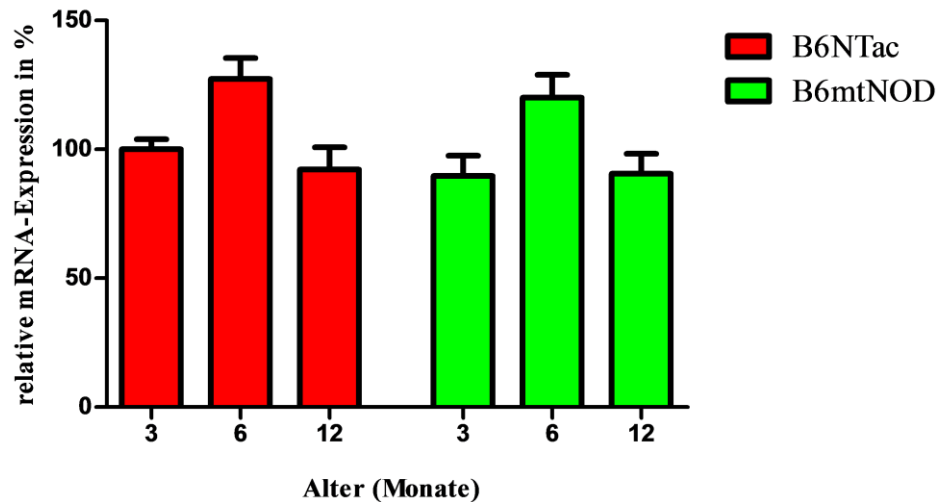


**Abb. 44: Katalase-Expression im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der Katalase im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

### 4.4.3.7 Tfam-Expression im Muskel

Die mRNA-Expression von Tfam lag sowohl bei den B6NTac wie auch den B6mtNOD Mäusen bei den 3 und 12 Monate alten Tieren auf einem vergleichbaren Niveau (Abb. 45). Lediglich in 6 Monate alten Tieren beider Mausstämmen war die Expression nicht signifikant höher (Abb. 45).

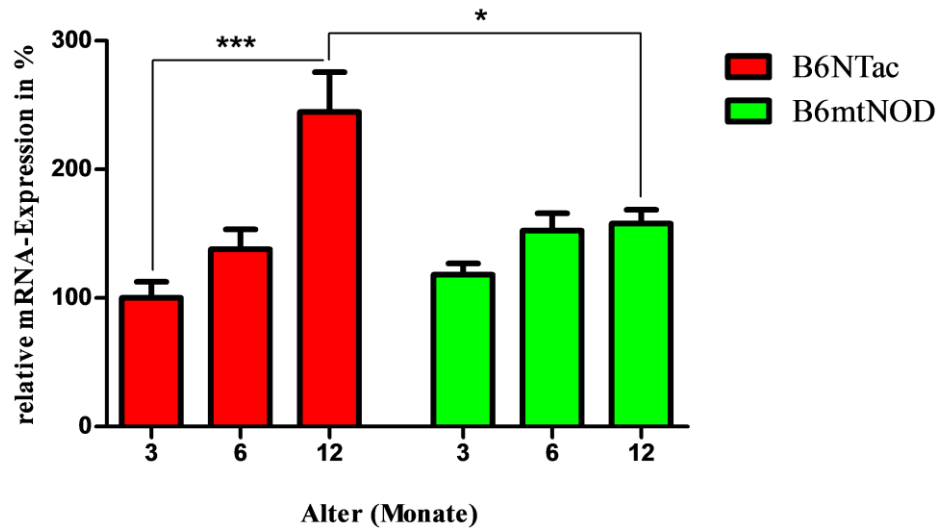


**Abb. 45: Tfam-Expression im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression von Tfam im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.

### 4.4.3.8 Pyruvatcarboxylase-Expression im Muskel

Die Expression der Pyruvatcarboxylase auf mRNA Ebene stieg im Muskel der B6NTac Tiere von den 3 auf die 12 Monate alten Tiere signifikant an (3 Monate B6NTac:  $100 \pm 28,19$  % vs. 12 Monate B6NTac:  $244,52 \pm 28,47$  %; Abb. 46). Im B6mtNOD Stamm konnte ebenfalls ein Anstieg der Expression von den 3 auf die 6 Monate alten Tiere beobachtet werden. Bei den 12 Monate alten Tieren verblieb die Expression, im Vergleich zu den 6 Monate alten B6mtNOD Tieren, auf einem ähnlichen Level. Zwischen den beiden Mausstämmen kam es in den 12 Monate alten Tieren zu einer signifikant höheren Expression der Pyruvatcarboxylase bei den B6NTac gegenüber den B6mtNOD Tieren (12 Monate B6NTac:  $244,52 \pm 28,47$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $157,86 \pm 15,41$  %; Abb. 46).

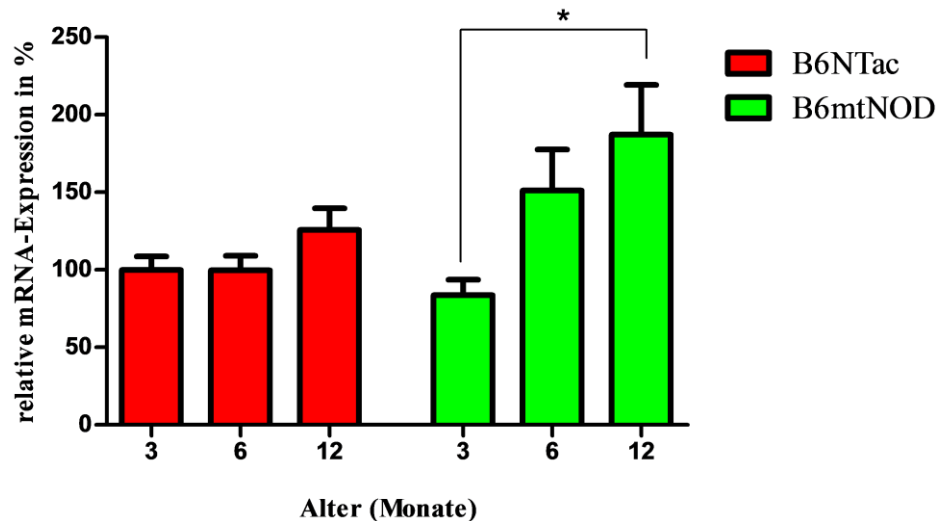


**Abb. 46: Pyruvatcarboxylase-Expression im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der Pyruvatcarboxylase im Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4.3.9 COX1-Expression im Muskel

Im Muskelgewebe der B6NTac Mäuse verblieb die COX1-Expression auf Ebene der mRNA bei den 3 und 6 Monate alten Tieren auf einem vergleichbaren Niveau und stieg bei den 12 Monate alten Tieren nicht signifikant an (Abb. 47). Im B6mtNOD Stamm kam es hingegen zu einem signifikanten Anstieg der Expression von den 3 auf die 12 Monate alten Mäuse (3 Monate B6mtNOD:  $83,71 \pm 23,89$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $187,24 \pm 34,24$  %; Abb. 47).



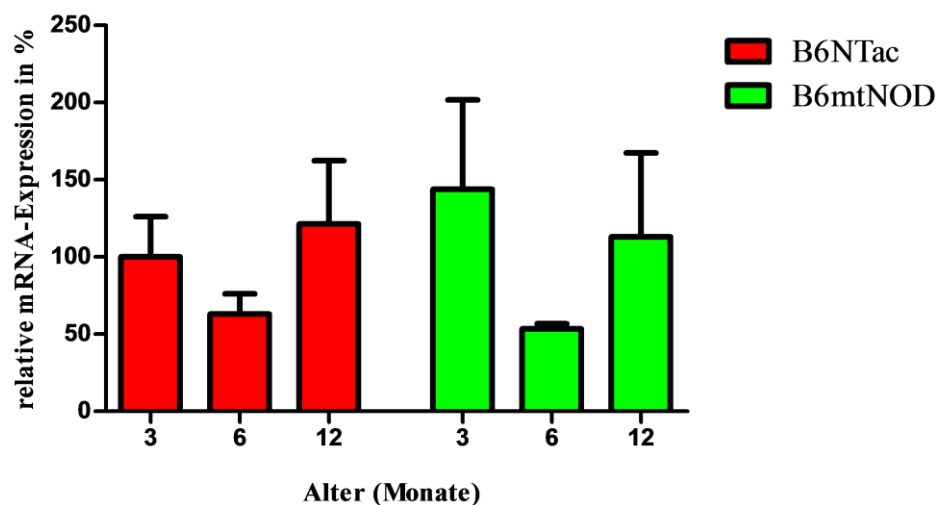
**Abb. 47: COX1-Expression im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der COX1 in % im Muskel von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten. \*p < 0,05 (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test)

### 4.4.4 Genexpressionanalysen isolierter Inseln aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen

#### 4.4.4.1 Cytochrom c1-Expression isolierter Inseln

Die relative Cytochrom c1-Expression auf mRNA Ebene der isolierten Inseln zeigt in beiden untersuchten Mausstämmen eine Abnahme bei den 6 Monate alten Tieren und einen Wiederanstieg bei den 12 Monate im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren (Abb. 48).

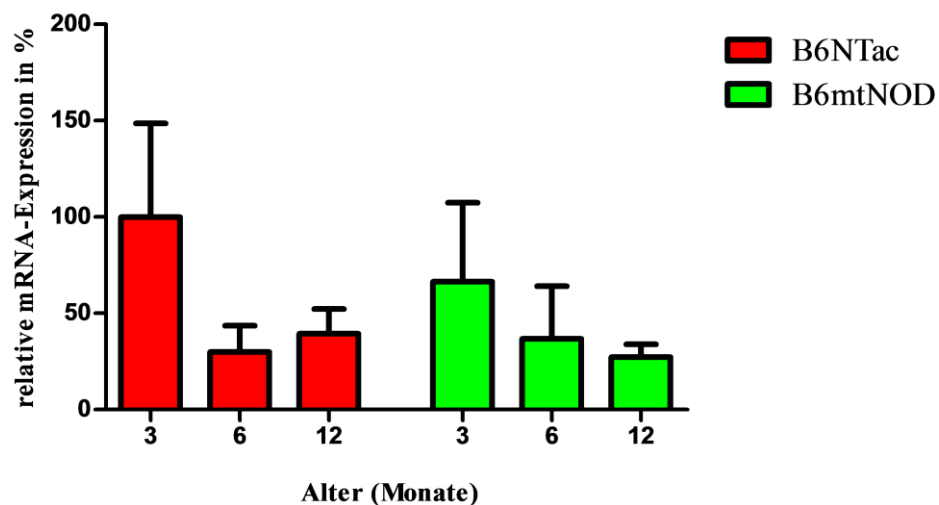


**Abb. 49: Cytochrom c1-Expression in isolierten Inselzellen aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression von Cytochrom c1 in % in isolierten Inseln von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3 (n = 3), 6 (n = 3) und 12 Monaten (n = 3).

### 4.4.4.2 Cox6b1-Expression isolierter Inseln

Die Cox6b1-Expression auf mRNA Ebene in den B6NTac Mäusen zeigte einen Expressionsabfall von den 3 auf die 6 Monate alten Tiere, gefolgt von einem geringen Anstieg bei den 12 Monate alten Tieren (Abb. 50). Im B6mtNOD Stamm nahm die Cox6b1-Expression auf Ebene der mRNA mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab (Abb. 50).

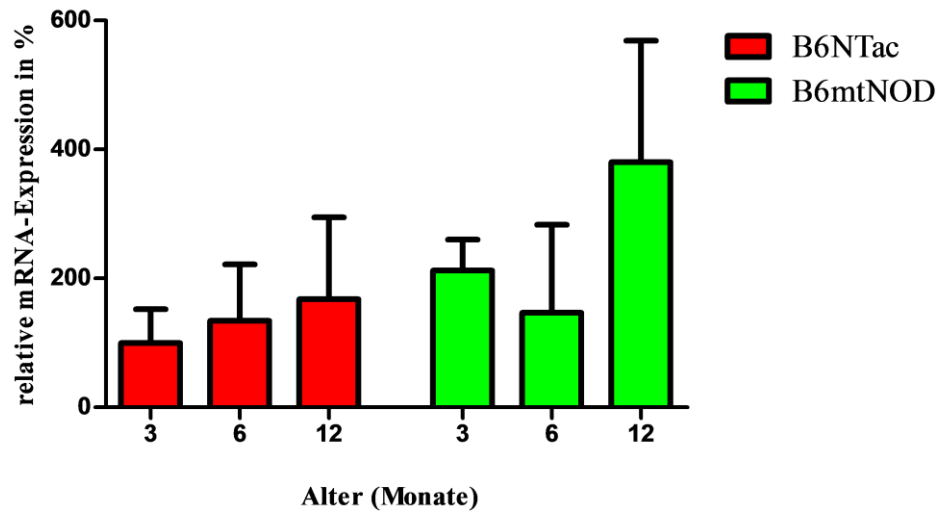


**Abb. 50: Cox6b1-Expression in isolierten Inselzellen aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der Cox6b1-Untereinheit in % in isolierten Inseln von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3 (n = 3), 6 (n = 3) und 12 Monaten (n = 3).

### 4.4.4.3 UCP2-Expression isolierter Inseln

Bei den B6NTac Tieren verzeichnete sich altersabhängig ein kontinuierlicher Expressionsanstieg an UCP2 auf Ebene der mRNA (Abb. 51). Der B6mtNOD Stamm zeigte eine vergleichbare Tendenz (Abb. 51). Insgesamt betrachtet lag die Expression an UCP2 bei den B6mtNOD Mäusen über derjenigen der B6NTac Tiere vergleichbaren Alters.

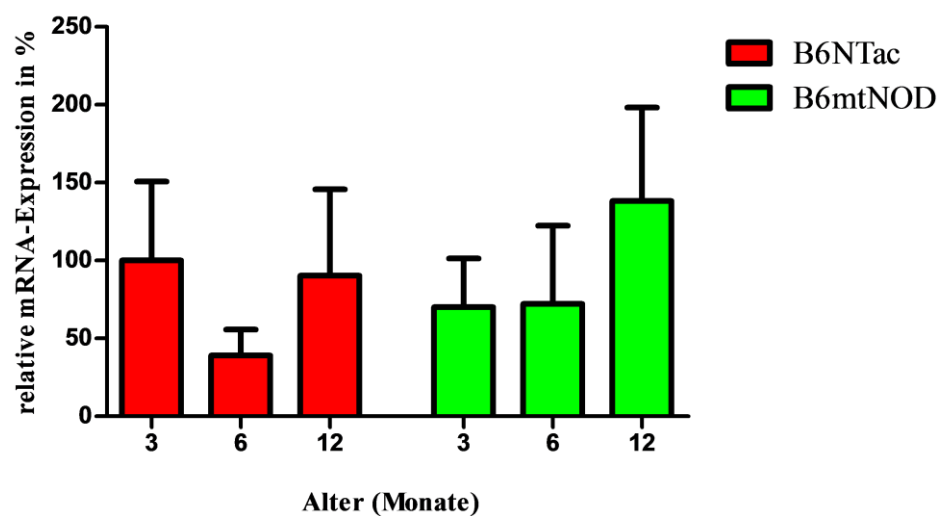


**Abb. 51: UCP2-Expression in isolierten Inselzellen aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression von UCP2 in % in isolierten Inseln von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3 (n = 3), 6 (n = 3) und 12 Monaten (n = 3).

#### 4.4.4.4 SOD1-Expression isolierter Inseln

Die relative Expression der SOD1 mRNA war bei den 3 und 12 Monate alten B6NTac Mäusen auf einem vergleichbaren Niveau, während jene der 6 Monate alten B6NTac Tiere deutlich darunter lag (Abb. 52). Im B6mtNOD Stamm kam es hingegen zu einem Expressionsanstieg mit zunehmendem Alter (Abb. 52).

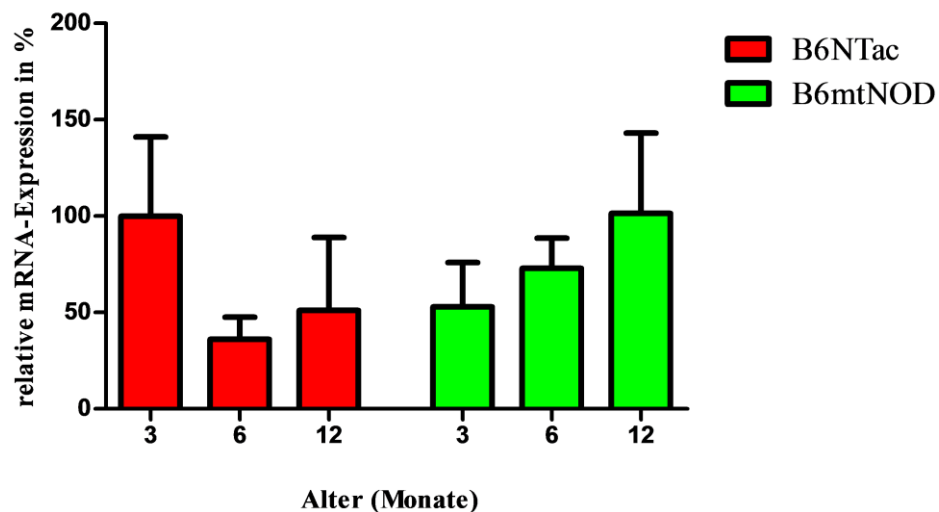


**Abb. 52: SOD1-Expression in isolierten Inselzellen aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der SOD1 in % in isolierten Inseln von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3 (n = 3), 6 (n = 3) und 12 Monaten (n = 3).

### 4.4.4.5 Tfam-Expression isolierter Inseln

Die relative Expression der Tfam mRNA im B6NTac Mausstamm lag bei den 3 Monate alten Tieren am höchsten. Es folgten ein Abfall bei den 6 und ein leichter Anstieg bei den 12 Monate alten Mäusen (Abb. 53). Im B6mtNOD Stamm kam es hingegen zu einem kontinuierlichen Expressionsanstieg mit zunehmendem Alter (Abb. 53). Insgesamt betrachtet lag die Expression von Tfam bei den B6mtNOD Mäusen im Alter von 3 Monaten unter, bei den 6 und 12 Monate alten Tieren über derjenigen der B6NTac Tiere vergleichbaren Alters.

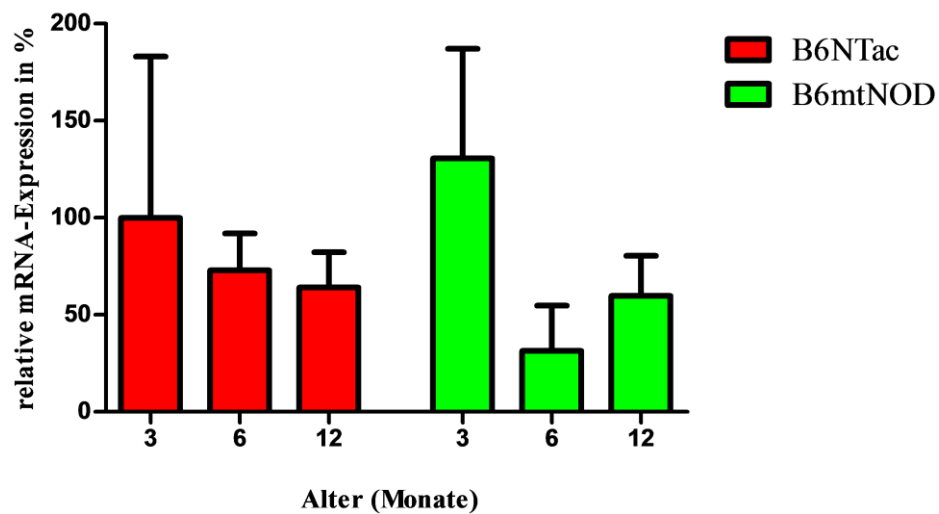


**Abb. 53: Tfam-Expression in isolierten Inselzellen aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression an Tfam in % in isolierten Inseln von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3 (n = 3), 6 (n = 3) und 12 Monaten (n = 3).

### 4.4.4.6 Pyruvatcarboxylase-Expression isolierter Inseln

Bei den B6NTac Tieren nahm die Expression der Pyruvatcarboxylase auf Ebene der mRNA altersabhängig tendenziell ab (Abb. 54). Im B6mtNOD Stamm konnte die höchste Expression zum Alterszeitpunkt der 3 Monate alten Mäuse gefunden werden. Es folgten ein Abfall bei den 6 und ein erneuter Anstieg bei den 12 Monate alten Tieren (Abb. 54).

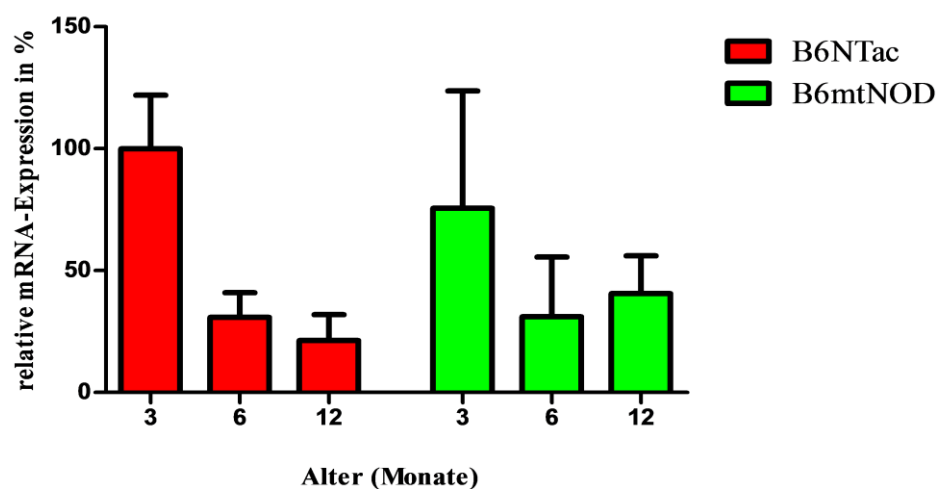


**Abb. 54 Pyruvatcarboxylase-Expression in isolierten Inselzellen aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression an Pyruvatcarboxylase in % in isolierten Inseln von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3 (n = 3), 6 (n = 3) und 12 Monaten (n = 3).

### 4.4.4.7 COX1-Expression isolierter Inseln

Bei den B6NTac Tieren kam es von den 3 auf die 12 Monate alten Tiere zu einem Expressionsabfall der COX1 auf Ebene der mRNA (Abb. 55). Bei den B6mtNOD Tieren war die Expression bei den 3 Monate alten Tieren ebenfalls am höchsten. Es folgten ein Abfall im Alter von 6 Monaten und die Tendenz zu einem Anstieg bei den 12 Monate alten Tieren (Abb. 55).



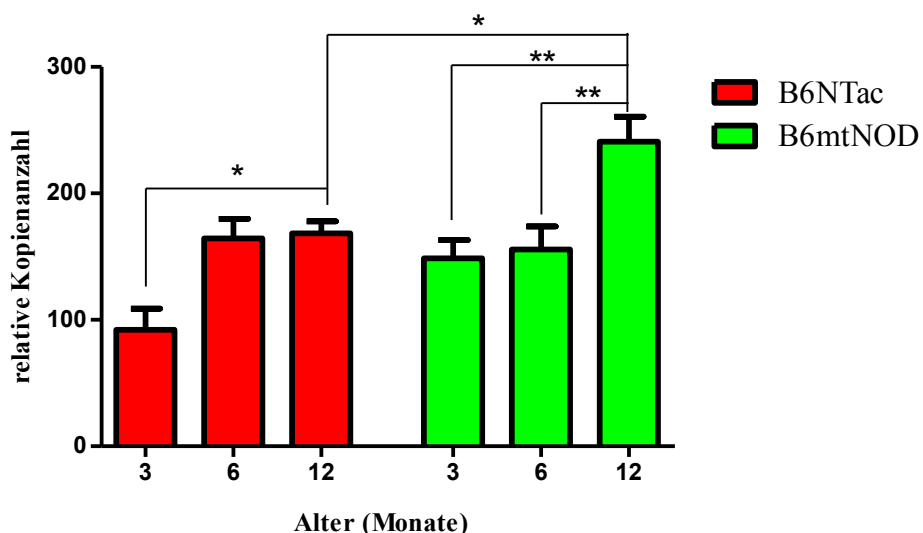
**Abb. 55: COX1-Expression in isolierten Inselzellen aus B6NTac und B6mtNOD Mäusen**

Relative mRNA-Expression der COX1 in % in isolierten Inseln von B6NTac und B6mtNOD Mäusen im Alter von 3 (n = 3), 6 (n = 3) und 12 Monaten (n = 3).



### 4.5 mtDNA-Gehalt der Leber von B6NTac und B6mtNOD Mäusen

Die geringste relative Kopienanzahl an mtDNA lag bei den 3 Monate alten B6NTac Mäusen vor. Im Alter von 6 Monaten kam es zu einem Anstieg des mtDNA-Pools, der bei den 12 Monate alten B6NTac Tieren konstant blieb. Die relative Kopienanzahl an mtDNA war bei den 12 Monate alten B6NTac Mäusen signifikant höher als in 3 Monate alten Tieren gleichen Genotyps (3 Monate B6NTac:  $100 \pm 44,2$  % vs. 12 Monate B6NTac:  $182,49 \pm 16,22$  %; Abb. 56). Im B6mtNOD Stamm war die relative Kopienanzahl der mtDNA bei den 3 Monate alten Tieren höher als in den B6NTac Mäusen gleichen Alters. Der mtDNA Gehalt der 6 Monate alten B6mtNOD Mäuse war mit dem der 3 Monate alten Tiere gleichen Genotyps vergleichbar. Signifikant nahm der mtDNA Gehalt von den 6 auf die 12 Monate alten B6mtNOD Mäuse zu (6 Monate B6mtNOD:  $195,58 \pm 46,35$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $261,0 \pm 23,24$  %; Abb. 56). Damit zeigte sich in der Gruppe der 12 Monate alten B6mtNOD Mäuse eine signifikant höhere relative Kopienanzahl an mtDNA gegenüber den 3 Monate alten Tieren gleichen Genotyps (3 Monate B6mtNOD:  $161,12 \pm 25,87$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $261,0 \pm 23,24$  %; Abb. 56) bzw. den 12 Monate alten B6NTac Tieren (12 Monate B6NTac:  $182,49 \pm 16,22$  % vs. 12 Monate B6mtNOD:  $261,0 \pm 23,24$  %; Abb. 56).



**Abb. 56: Relative Kopienanzahl der mtDNA in der Leber**

Relative Anzahl an mtDNA Kopien in der Leber von B6mtNOD und B6NTac Mäusen im Alter von 3 (n = 6-8 ), 6 (n = 6-8 ) und 12 (n = 6-8 ) Monaten. Der Wert für 3 Monate B6NTac ist als 100 % gesetzt worden. \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 (ONE WAY ANOVA/Bonferroni's-Test).

### 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der konplastische Mausstamm B6mtNOD (C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup>) mit dem Hintergrundstamm B6NTac (C57BL/6NTac) hinsichtlich metabolischer Parameter und der Expression regulierender Enzyme untersucht. Im Vergleich zu den B6NTac Tieren liegt im B6mtNOD Stamm eine Mutation innerhalb der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV der Atmungskette) vor. Dadurch kommt es in der mitochondrial codierten Untereinheit Cox3 an Position nt9348a zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin (Yu, X. et al. 2009).

Die genaue Funktion von Cox3 ist bislang noch nicht geklärt. Studien an Mäusen konnten jedoch zeigen, dass Cox3 in der Lage ist ein zusammengefügtes Intermediat mit dem Superkomplex aus den Untereinheiten Cox1, Cox6 und Cox5 der Cytochrom-c-Oxidase auszubilden und diesen damit zu stabilisieren (Mick, D.U. et al. 2011). Weiterhin bilden auch die Untereinheiten der Atmungskette miteinander Superkomplexe aus und stabilisieren sich so gegenseitig. Der als Respirasom bezeichnete Superkomplex aus Komplex I, III und IV führt hierbei vermutlich zu einer Limitation der ROS Produktion über die Atmungskette (Winge, D.R. 2012). Besonders Komplex I, als Haupteintrittspunkt der Elektronen, wird über diese Komplexbildung stabilisiert (Li, Y. et al. 2007). Komplex III und Komplex IV Defizite können somit zu einem Defekt in Komplex I führen, welcher wiederum in einer mitochondrialen Dysfunktion münden kann (Li, Y. et al. 2007). Eine mögliche Folge ist unter anderem eine gesteigerte ROS Produktion über die Atmungskette. Im B6mtNOD Stamm könnte es durch die Mutation in Cox3 zu einer mangelnden Komplexbildung der Cytochrom-c-Oxidase kommen. Dies könnte im Weiteren Auswirkungen auf die Stabilität und Komplexbildung der gesamten Atmungskette haben, deren Effizienz dadurch sinkt. Auch eine erhöhte ROS Bildung könnte die Folge sein.

In dieser Arbeit wurden Mäuse zu den Alterszeitpunkten 3, 6 und 12 Monaten untersucht. Dies entspricht beim Menschen etwa einem Alter von etwa 20, 30 und 45 Jahren. Betrachtet wurden dementsprechend in dieser Studie junge Erwachsene bis hin zu einem mittleren Lebensalter. Die metabolischen Untersuchungen der Tiere umfassten die Bestimmung von Gewicht und Blutglukose sowie die Insulinsekretion von isolierten Langerhans'schen Inseln. Um einen Einblick in Adaptationsprozesse in unterschiedlichen Geweben zu erhalten, wurde die Genexpression des mitochondrialen Transkriptionsfaktors Tfam, von Cytochrom c1 und Cox6b1 als nukleär kodierte Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen, des Entkopplerproteins UCP2, der antioxidativen Enzyme

Katalase, SOD1 und SOD2, der Pyruvatcarboxylase und der Cyclooxygenase 1 in Leber, Muskulatur, Gehirn und  $\beta$ -Zellen des Pankreas bestimmt.

### 5.1 Vergleich von 3 Monate alten B6mtNOD Mäusen mit dem Hintergrundstamm B6NTac

Am Ende der Wachstumsphase mit 3 Monaten zeigten die B6mtNOD Tiere ein etwas niedrigeres Körpergewicht und einen niedrigeren Blutzuckerspiegel im Vergleich zu B6NTac Mäusen. Dies deutet auf eine schlechtere Stoffwechseleffizienz in den Geweben hin, die mit der Cox3 Mutation in Verbindung gebracht werden könnte.

Betrachtet man das Gehirn als insulinunabhängiges Organ, konnte dort eine signifikant geringere Expression des mitochondrialen Transkriptionsfaktors Tfam ermittelt werden. Tfam ist notwendig für die Replikation des mitochondrialen Genoms (Klinge, C.M. 2008). Gleichzeitig war die Expression von Cytochrom c1 und Cox6b1 erniedrigt, beides nukleär kodierte Untereinheiten von Komplex III und IV der Atmungskette. Dies ist ein eindeutiger Hinweis auf eine verminderte mitochondriale ATP-Generierung aufgrund einer reduzierten Atmungskettenkapazität, die einen erhöhten Glukoseverbrauch nach sich ziehen könnte. Zu dieser Annahme passt auch die verminderte Expression von UCP2 in B6mtNOD im Vergleich zu B6NTac Tieren. In der Arbeitsgruppe konnte durch Jan Niemann gezeigt werden, dass die Bildung von mitochondrialem ROS im Gehirn von B6mtNOD Tieren im Vergleich zu B6NTac Mäusen signifikant höher war (Niemann, J. et al. 2013; Anhang 1 C). Die erhöhten ROS Werte könnten einen Einfluss auf den Zellstoffwechsel haben. Darauf deutet auch die im Vergleich zum B6NTac Mausstamm höhere Expression von Katalase und SOD2 hin, wohingegen die zytosolisch lokalisierte SOD1 eher vermindert exprimiert war.

Die glukosestimulierte Insulinsekretion im Alter von drei Monaten war vermindert. In den  $\beta$ -Zellen des Pankreas könnte somit ein vergleichbarer Zustand mit unzureichender mitochondrialer ATP-Generierung vorliegen. Dadurch ist die Stimulus-Sekretionskopplung vermindert, wogegen die basale Insulinsekretion vergleichbar zum Kontrollstamm ausfällt, wie experimentell gezeigt werden konnte. Hierfür würde sprechen, dass die Expression von Tfam und Cox6b1 in den isolierten Inseln tendenziell vermindert war. Abschließende Aussagen lassen sich hier aber nicht treffen, aufgrund der zu hohen Standardabweichung bei den Genexpressionsanalysen. Da es sich bei der Isolierung von Langerhans'schen Inseln um einen sehr aufwändigen Prozess mit einer geringen Zellausbeute pro Tier handelt, konnten innerhalb dieser Arbeit keine weiteren Experimente

durchgeführt werden. Dies sollte in weiterführenden Untersuchungen aber erfolgen, um die hier aufgestellte Hypothese zu stärken. In einem anderen konplastischen Mausstamm, der im Vergleich zum Kontrollstamm eine Mutation in ATP8, einer mitochondrial kodierten Untereinheit der ATP-Synthase trägt, konnte eine erhöhte Generierung von ROS und eine verminderte glukosestimulierte Insulinsekretion in  $\beta$ -Zellen des Pankreas nachgewiesen werden (Weiss, H. et al. 2012). Aufgrund der niedrigeren Insulinsekretion in B6mtNOD Tieren im Vergleich zum Kontrollstamm sollte die Glukoseaufnahme in die insulinabhängigen Gewebe wie Muskulatur und Fettgewebe vermindert sein. Der Glukosetransporter GLUT4 wird nur in Anwesenheit von Insulin in die Zellmembran eingebaut (Deutzmann, R., Kapitel 20.1.1, 2006). Dies könnte auch Ursache für das leicht verminderte Körpergewicht der B6mtNOD Tiere sein.

Interessanterweise weisen die Genexpressionsanalysen im Muskel von 3 Monate alten B6mtNOD Tieren auf keine deutlichen Veränderungen im Stoffwechsel zum Kontrollstamm B6NTac hin. Nur das Expressionsniveau der antioxidativen Enzyme, mit einer erniedrigten SOD2- und erhöhten Katalase-Expression könnte die Antwort auf eine erhöhte ROS Produktion sein. Tatsächlich konnte eine erhöhte mitochondriale ROS Bildung im Muskel in B6mtNOD Tieren im Vergleich zu B6NTac Mäusen gezeigt werden (Anhang 1 B).

In der Leber wurden hingegen kontroverse Ergebnisse ermittelt. Während die Cytochrom c1- und Tfam-Expression deutlich vermindert war, war die Cox6b1-Expression nur leicht erniedrigt und der Gehalt an mtDNA sogar erhöht. Da Tfam die Replikation der mtDNA direkt beeinflusst (Klinge, C.M. 2008), wäre hier eine Korrelation zwischen Tfam-Expression und mtDNA Gehalt zu erwarten gewesen. Möglicherweise finden im Alter von 3 Monaten, induziert durch die Cox3 Mutation aber gerade Adaptationsvorgänge statt, die durch bislang noch unbekannte Rückkopplungsmechanismen diese Diskrepanz erklären könnten. Um die Veränderungen in der Leber von B6mtNOD Tieren beurteilen zu können, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. In der Arbeitsgruppe konnte durch Jan Niemann gezeigt werden, dass in isolierten Hepatozyten von B6mtNOD Tieren sowohl die Tfam als auch die Cox6b1-Expression im Vergleich zu B6NTac erhöht war (Niemann, J. et al. 2013). Diese Ergebnisse korrelieren mit dem in dieser Arbeit ermittelten erhöhten Gehalt an mtDNA und deuten auf eine erfolgreiche Adaptation des mitochondrialen Leberstoffwechsels an die Cox3 Mutation hin. Auch auf gesteigerte Inflammation oder einen erhöhten antioxidativen Abwehrstatus in der Leber gibt es auf Basis der in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen keinen Hinweis. Dies ist ebenfalls in Übereinstimmung damit, dass kein Unterschied in der Bildung von

mitochondrialen ROS in der Leber von B6mtNOD Tieren im Vergleich zu B6NTac Tieren gefunden werden konnte (Anhang 1 A). Es lässt sich also schlussfolgern, dass die Mutation in Cox3 nicht zu einer allgemein ausgeprägten Veränderung im mitochondrialen Stoffwechsel führt, die in allen Zellen gleichermaßen erfolgt, sondern organspezifisch zu sehr unterschiedlichen Veränderungen bzw. zur Induktion von Adaptationsvorgängen führt.

### **5.2 Vergleich von 6 Monate alten B6mtNOD Mäusen mit dem Hintergrundstamm B6NTac**

Solche Veränderungen lassen sich in 6 Monate alten B6mtNOD Mäusen im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren erkennen. In 6 Monate alten B6mtNOD Mäusen lag der Blutzuckerspiegel weiter unter dem in B6NTac Mäusen ermittelten Werten. Allerdings zeigten isolierte Langerhans'sche Inseln eine im Vergleich zu den aus 3 Monate alten Tieren isolierten Inseln eine signifikant höhere glukosestimulierte Insulinsekretion, die sogar noch über derjenigen der Kontrolltiere lag. Dies deutet auf eine Adaptation des mitochondrialen Stoffwechsels in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas hin, die durch die erhöhte Tfam-Expression erklärt werden könnte. Alle weiteren in den Langerhans'schen Inseln analysierten Gene lagen in der Expression auf einem vergleichbaren Niveau wie im B6NTac Mausstamm. Anzumerken ist hier, dass die Expression von Tfam und Cox6b1 in Langerhans'sche Inseln im B6NTac Mausstamm tendenziell in 6 Monate alten Tieren im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren abnahm.

Interessanterweise konnte ein ähnlicher Verlauf im Gehirn beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie mit alternden Ratten eine Zunahme der Tfam-Expression im frontalen Cortex beschrieben (Picca, A. et al. 2014). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass in dieser Studie das gesamte Gehirn und nicht nur eine einzelne Region betrachtet wurde. Eine Arbeit die den mtDNA Gehalt im Gehirn von Mäusen untersucht hat, zeigte eine Abnahme desselbigen mit dem Alter auf (Masuyama, M. et al. 2005). Auf der Basis der hier vorliegenden Ergebnisse deutet sich ein altersabhängiger Adaptationsprozess an, der zu einer Angleichung der Expression der untersuchten Gene zwischen beiden Mausstämmen im Gehirn führt. Ein deutlicher Hinweis auf einen weiterhin gesteigerten Substratumsatz stellt aber die erhöhte Expression der Pyruvatcarboxylase dar. In vitro Studien konnten zeigen, dass im Gehirn ein großer Teil des über die Pyruvatcarboxylase gebildeten Oxalacetats zu einer gesteigerten Synthese bestimmter Intermediate des Zitratzyklus führt, über die die Bildung von Glutamat als Transmitter

unterstützt wird (Hassel, B. & Brathe, A. 2000). Dabei besteht in den Zellen ein Puffersystem, über welches sich die Glutamat-Synthese und der Glutamat-Abbau die Waage halten (Gowda, K. et al. 2011). Oxidativer Stress kann dieses System aus dem Gleichgewicht bringen. Die ROS Bildung im Gehirn der 6 Monate alten B6mtNOD Tiere nahm, im Vergleich zu den 3 Monate alten Tieren gleichen Genotyps, nicht weiter zu, lag aber immer noch über dem Wert der altersgleichen Kontrolltiere (Anhang 1 C).

Im Muskel zeigte sich dagegen eine Abnahme der ROS Bildung im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren (Anhang 1 B). Allerdings lag der Wert weiterhin über dem der B6NTac Kontrolltiere. In dieser Studie konnten keine Unterschiede in der Genexpression im Muskel zwischen B6mtNOD und B6NTac Tieren ermittelt werden. Die Glukoseaufnahme sollte zu diesem Alterszeitpunkt in beiden Mausstämmen vergleichbar sein, da nun keine verminderte glukosestimulierte Insulinsekretion in B6mtNOD Tieren mehr vorlag. Im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren zeigten beide Mausstämme einen Anstieg der Tfam-Expression im Muskel. Beim Menschen wird ein deutlicher Anstieg der Tfam-Expression im Skelettmuskel mit zunehmendem Alter berichtet (Lezza, A.M. et al. 2001). In einer anderen Studie wurde aber auch eine Abhängigkeit der Tfam-Expression von der körperlichen Aktivität beim Menschen gezeigt (Bori, Z. et al. 2012). Es ist zu berücksichtigen, dass die Aktivität der hier untersuchten Inzuchtstämme durch die Käfighaltung reduziert ist, so dass möglicherweise dadurch der Anstieg der Tfam-Expression deutlich geringer als beim Menschen ausgefallen ist und nicht signifikant war. Bei alternden Ratten wurde sogar eine Abnahme der Tfam-Expression im Muskel beschrieben (Picca, A. et al. 2014). An dieser Stelle wäre es sehr interessant, den Einfluss von Training auf den konplastischen Mausstamm B6mtNOD im Vergleich zum Kontrollstamm zu untersuchen. Bei einer solchen Belastung könnte der Einfluss der Cox3 Mutation auf den mitochondrialen Stoffwechsel im Muskel deutlich ausgeprägter sein. Das Gewicht der B6mtNOD und B6NTac Tiere war im Alter von 6 Monaten gleich und entsprach dem für den C57BL/6NTac Inzuchtstamm berichteten Gewicht des Züchters von etwa 34 g. Im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren kam es wie erwartet zu einer Gewichtszunahme.

In der Leber der B6mtNOD Mäuse deuten die Ergebnisse auf eine Adaptation an die Cox3 Mutation hin. Cytochrom c1 und Cox6b1 waren im Vergleich zum B6NTac Stamm noch leicht erhöht. Die Tfam-Expression in den B6mtNOD Mäusen erreichte das Niveau der B6NTac Mäuse. Hier korrelierte das Ergebnis mit dem ermittelten mtDNA Gehalt, der ebenfalls bei beiden Mausstämmen auf gleichem Niveau lag. Der Substratverbrauch scheint aber in den B6mtNOD Mäusen höher zu sein. Die Pyruvatcarboxylase-Expression war signifikant erhöht. Zusätzlich war die UCP2-Expression signifikant erniedrigt, was

auf eine Effizienzsteigerung in der Atmungskette hindeutet. Hier zeigten Leber und Gehirn von B6mtNOD Mäusen eine gleiche Tendenz. Die Expression der SOD2 in der Leber der B6mtNOD Mäuse war im Vergleich zu den B6NTac Mäusen aber erniedrigt. Es scheint also in der Leber nicht zu einer gesteigerten ROS Bildung zu kommen. Diese Vermutung wird in der Arbeitsgruppe durch die Ergebnisse von Jan Niemann direkt bestätigt, der keine Unterschiede in der mitochondrialen ROS Bildung zwischen den Mausstämmen gefunden hat (Anhang 1 A). Die Leber verfügt über ein im Vergleich zu anderen Organen und insbesondere zu  $\beta$ -Zellen des Pankreas hohes Expressionsniveau an antioxidativen Enzymen und scheint daher gut gegen dessen toxische Wirkung geschützt zu sein (Tiedge et al. 1997). Zudem ist zu berücksichtigen, dass ROS nach aktueller Ansicht nicht als ursächliche Quelle der Alterung angesehen werden kann. Vielmehr steht seine Rolle als Signalmolekül im Vordergrund, welches über Insulin, Zytokine und viele Wachstumsfaktoren eine Adaptation der Zellfunktionen an die Alterungsbedingungen bewirkt (Hekimi, S. et al. 2011).

### **5.3 Vergleich von 12 Monate alten B6mtNOD Mäusen mit dem Hintergrundstamm B6NTac**

Bei 12 Monate alten Tieren zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen. Die glukosestimulierte Insulinsekretion sank im Vergleich zu 6 Monate alten B6mtNOD Mäusen wieder ab und lag unter der der gleichalten B6NTac Mäuse. Zwar nahm die Tfam-Expression in den Inseln weiter zu, aber die notwendige Kompensation des mitochondrialen Stoffwechsels scheint auch zu einer erhöhten ROS Bildung zu führen. Darauf deutet die erhöhte UCP2- und SOD1-Expression hin. Es ist daher von großem Interesse, die mitochondriale ROS Bildung in einzelnen  $\beta$ -Zellen in weiterführenden Studien direkt zu untersuchen, um diese Hypothese zu bestätigen. Nach den hier vorliegenden Befunden scheint die Adaptation in den Langerhans'schen Inseln der 6 Monate alten B6mtNOD Mäuse damit nur transient gewesen zu sein und sich nicht mit dem Lebensalter zu stabilisieren. Wahrscheinlich aufgrund der niedrigeren Insulinsekretion liegt der Blutglukosespiegel der B6mtNOD Mäuse im Alter von 12 Monaten nun über dem des Hintergrundstamms.

Im Gehirn blieben die für die 6 Monate alten Tiere beschriebenen Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen bestehen. Die Pyruvatcarboxylase-Expression stieg weiter an und war damit fast doppelt so hoch wie bei B6NTac Mäusen. Zudem konnte eine signifikant höhere mitochondriale ROS Bildung in 12 Monate alten Mäusen sowohl im Vergleich zu

6 Monate alten B6mtNOD Tieren als auch zu altersgleichen B6NTac Mäusen ermittelt werden (Anhang 1 C). Zwar nahm die Expression der Katalase im B6mtNOD Mausstamm im Vergleich zu 6 Monate alten Tieren zu, die Expression der SOD2 blieb aber gleich. Allerdings könnten hier weitere antioxidative Enzyme, wie die Thioredoxin-Proxidase oder Gluthathion-Reduktase bzw. Proteine, wie das DJ-1, eine wichtige Rolle spielen. DJ-1 ist ein multifunktionales antioxidatives Protein, welches durch das Gen der Parkinson Erkrankung Park7 gebildet wird (Dawson, TM. & Dawson VL. 2003; Guzman, M. et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass es in neuronalem Gewebe zu einem Anstieg der DJ-1-Expression infolge von oxidativem Stress kommt, um einer mitochondrialen Dysfunktion vorzubeugen (McCoy, MK. & Cookson, MR. 2012). In weiterführenden Studien sollte daher die Expression von DJ-1 im Gehirn untersucht werden. Möglicherweise ist ein durch die Cox3 Mutation vermittelter fehlender Anstieg von DJ-1 ursächlich für die hohe ROS Bildung im B6mtNOD Mausstamm.

Im Muskel zeigte sich im Gegensatz zum Gehirn im B6NTac Hintergrundstamm ein altersabhängiger Anstieg der Pyruvatcarboxylase mit den höchsten Werten in 12 Monate alten Tieren. Dieser blieb in B6mtNOD Mäusen aus. Dies könnte ein Schutz gegen eine weitere Erhöhung von ROS und Inflammation sein, denn es konnte in dieser Studie eine erhöhte COX1-Expression im Muskel ermittelt und in der Arbeitsgruppe durch Jan Niemann ein sprunghafter Anstieg der mitochondrialen ROS Bildung aufgezeigt werden (Anhang 1 B). Zudem lag die Expression des antioxidativen Enzyms Katalase in B6mtNOD Mäusen deutlich unter der der B6NTac Tiere. Die Ergebnisse deuten damit auch im Muskel eine Dekompensation des mitochondrialen Stoffwechsels an.

Ein anderes Bild zeigte sich dagegen in der Leber. Hier stieg in beiden Mausstämmen die mitochondriale ROS Produktion zwar altersabhängig weiter an, signifikante Unterschiede zwischen B6mtNOD und B6NTac Tieren konnten aber nicht gefunden werden (Anhang 1 A). Lediglich tendenziell war die ROS Produktion in B6mtNOD Mäusen höher. Dies könnte mit der in dieser Studie ermittelten erhöhten Expression der Pyruvatcarboxylase und verminderten Expression von UCP2 in B6mtNOD Mäusen im Vergleich zu B6NTac Tieren begründet werden.

Interessanterweise stieg in B6NTac Tieren sowohl im Gehirn als auch in der Leber die Expression der SOD1 im Alter von 12 Monaten sprunghaft an. Deutlich geringer und nicht signifikant fiel der Anstieg in den konplastischen B6mtNOD Mäusen aus. In weiterführenden Studien sollte mittels Western Blot Analysen untersucht werden, ob sich der Anstieg der SOD1-Expression gleichermaßen auch auf Proteinebene nachweisen lässt. SOD1 scheint nicht nur im Zytosol sondern auch im mitochondrialen Intermem-



branraum eine wesentliche Rolle zu spielen. In Zusammenhang mit der amyotrophen Lateralsklerose, einer degenerativen Erkrankung des motorischen Nervensystems, die auch durch Mutationen im SOD1 Gen verursacht werden kann, wurde gezeigt, dass die SOD1 im Intermembranraum einen wesentlichen Schutz gegen die mitochondriale Bildung von ROS darstellen könnte (Klöppel, C. 2010). Um die Lokalisation der SOD1 in B6NTac und B6mtNOD Mäusen zu untersuchen, sollten weiterführend Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten der Leber und des Gehirns im Vergleich zum Muskel durchgeführt werden. Allerdings wird die Rolle und die Lokalisation der SOD1 in Zusammenhang mit der ROS Bildung aktuell kontrovers diskutiert. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von SOD1 im Intermembranraum der Mitochondrien die Cytochrom c katalysierte Peroxidation kontrolliert und zu einem Anstieg von ROS führt (Goldsteins, G. 2008). Auch andere Studien bringen die SOD1 in Zusammenhang mit Cytochrom c. Bei einem Anstieg der mitochondrialen ROS Produktion soll es zu einer gleichzeitigen Freisetzung von SOD1 und Cytochrom c kommen, was die Empfindlichkeit der Mitochondrien gegen oxidativen Stress erhöht und eine Apoptose begünstigt (Li, M.H. et al. 2006; Li, Q. et al. 2009). Im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wird allerdings wiederum das protektive Zusammenspiel von SOD1 und DJ-1 in den Vordergrund gestellt (Milani, P. et al. 2013). Möglicherweise ist das Protein Nrf2, ein wesentlicher Transkriptionsfaktor für viele antioxidative Enzyme, der Schlüsselregulator des Prozesses. Denkbar ist aber auch eine organspezifische Regulation, wie sie in dieser Studie für unterschiedliche Gene im Alterungsprozess aufgezeigt werden konnte.

### 5.4 Ausblick

Durch Funktionseinschränkungen innerhalb der Atmungskette, in dieser Arbeit im B6mtNOD Stamm ausgelöst durch eine mtDNA Mutation in Cox3, kann es zu einem deutlichen Anstieg des intrazellulären ROS Levels mit Auswirkungen auf die Genexpression kommen. Bereits Untersuchungen an  $\beta$ -Zellen von Mäusen mit einer mtDNA Mutation im Atp8-Gen zeigten eine gesteigerte mitochondriale ROS Bildung, reduzierte zelluläre ATP-Level sowie einen direkten Effekt des Redoxstatus der Zellen auf die Größe der Mitochondrien (Weiss, H. et al. 2012). Zum Schutz der Zellen vor gesteigerter ROS Bildung nehmen antioxidative Enzyme, wie die SOD1, eine wichtige Rolle ein. Untersuchungen homozygoter SOD1-Knockout-Mäuse (SOD1<sup>-/-</sup>) heben einen Anstieg der ROS Generierung in Leber und Gehirn hervor, was sich auch in dieser Arbeit

nachweisen lies (Watanabe, K. et al. 2014). In C57BL/6 Modellmäusen für Amyotrophe Lateralsklerose mit einer G37R Punktmutation im SOD1-Gen konnten zudem Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren in Bezug auf die Progression der Erkrankung gefunden werden (Zwiegers, P. et al. 2014). Es wäre folglich von Bedeutung die zelluläre Genexpression und ROS Bildung nochmals geschlechtsspezifisch im Vergleich zu untersuchen.

Ebenfalls von Interesse im Zusammenhang mit einer gesteigerten mitochondrialen ROS Bildung ist das jüngst identifizierte ubiquitär vorkommende DJ-1 Protein (Toyoda, Y. et al. 2014; Zondler, L. et al. 2014). Als multifunktionales redoxsensitives Protein spielt es eine wichtige Rolle in der Reduktion von mitochondrialem Stress und der Stimulation von anti-apoptotischer sowie anti-oxidativer Genexpression. Weiterhin kann DJ-1 unter oxidativem Stress die Aktivität von Komplex I der Atmungskette unterstützen (Pantcheva, P. et al. 2014). In dieser Arbeit konnten Unterschiede in der Expression von kernkodierten Untereinheiten der Komplexe III und IV ermittelt werden. Ob dies DJ-1 vermittelte Adaptationsprozesse im B6mtNOD Mausstamm sind, muss weiterfolgend noch untersucht werden. Für DJ-1 konnte eine Chaperon ähnliche Aktivität und die Fähigkeit Kupfer-Ionen an Cystein 106 zu binden, nachgewiesen werden. Unter oxidativem Stress kann DJ-1 so zu SOD1 transferiert werden und dessen katalytische Funktion aktivieren. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass es zu einer direkten Interaktion zwischen DJ-1 und SOD1 kommt (Zondler, L. et al. 2014). In dieser Arbeit konnte eine signifikant geringere SOD1-Expression in der Leber und im Gehirn der 12 Monate alten B6mtNOD Tiere gegenüber dem B6NTac Stamm gefunden werden. Neben dem Nachweis dieser Unterschiede auch auf Proteinebene, wäre es interessant die katalytische Aktivität der antioxidativen Enzyme zu bestimmen. Nachfolgend könnte dann der Einfluss von DJ-1 auf diesen Prozess im B6mtNOD und B6NTac Stamm genauer untersucht werden.

### 6 Zusammenfassung

Die mitochondrial lokalisierte Atmungskette ist für den zellulären oxidativen Stoffwechsel essentiell. Die Cytochrom-c-Oxidase katalysiert die finale Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff. Ihre Untereinheiten Cox1-3 werden mitochondrial kodiert.

Der konplastische Mausstamm B6mtNOD (C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup>) unterscheidet sich vom Hintergrundstamm B6NTac (C57BL/6NTac) durch den mt9348A Polymorphismus in Cox3 der Cytochrom-c-Oxidase. Diese Mutation im B6mtNOD Stamm scheint zu einer Instabilität der Cytochrom-c-Oxidase mit verminderter Effizienz der gesamten Atmungskette zu führen. Folgen sind eine gesteigerte ROS Generierung über die Atmungskette sowie ein intrazelluläres Stoffwechseldefizit im Vergleich zum B6NTac Stamm. Organspezifisch kommt es so zu sehr unterschiedlichen Veränderungen bzw. zu einer Induktion von Adaptationsvorgängen in den einzelnen Geweben.

In den  $\beta$ -Zellen der 3 Monate alten B6mtNOD Tiere deuten eine geringere Tfam- und Cox6B1-Expression auf eine verminderte Aktivität der Atmungskette mit unzureichender ATP-Generierung hin. Dies könnte eine Rolle bei der im Vergleich zu B6NTac Tieren verminderten glukosestimulierten Insulinsekretion im B6mtNOD Stamm spielen. Es kann vermutet werden, dass hierbei auch die Glukoseaufnahme in insulinsensitive Gewebe wie Muskulatur und Fettgewebe vermindert ist, während der Verbrauch an Glukose in insulinunabhängigen Geweben ansteigt, um die verminderte Aktivität der Atmungskette zu kompensieren. Dies scheint mit einer Erklärung für das tendenziell geringere Gewicht und den geringeren Blutzuckerspiegel der B6mtNOD Tiere gegenüber dem B6NTac Stamm zu sein.

Im Gehirn der 3 Monate alten B6mtNOD Mäuse deutet die verminderte Expression an Cytochrom c1 und Cox6b1, UCP2 sowie von Tfam ebenfalls auf eine gestörte mitochondriale ATP-Generierung hin. Katalase und SOD2 werden hingegen vermehrt exprimiert, vermutlich um der signifikant gesteigerten ROS Bildung (alle Ergebnisse zur ROS Bildung im Anhang), entgegen zu wirken.

Im Muskel der 3 Monate alten B6mtNOD Tiere konnten, bis auf eine verminderte SOD2-Expression, keine Unterschiede zur Vergleichsgruppe gefunden werden, obwohl ein tendenziell höheres ROS Level gegenüber dem B6NTac Stamm aufgezeigt werden konnte.

In der Leber der 3 Monate B6mtNOD Mäuse wurden hingegen kontroverse Ergebnisse ermittelt. Während die Cytochrom c1- und Tfam-Expression deutlich, die der Cox6b1

leicht vermindert war, war der Gehalt an mtDNA sogar erhöht. Es ist möglich, dass induziert durch die Mutation in Cox3, Adaptationsvorgänge stattfinden, die durch weiterführende Untersuchungen noch näher untersucht werden müssen.

Im Alter von 6 Monaten scheint es zu weiteren Adaptationsvorgängen im B6mtNOD Stamm zu kommen. In den  $\beta$ -Zellen der B6mtNOD Mäuse zeigte sich eine erhöhte Tfam-Expression sowie eine signifikant gesteigerte glukosestimulierte Insulinsekretion im Vergleich zum B6NTac Stamm. Dies lässt vermuten, dass die Glukoseaufnahme in insulinsensitive Gewebe gesteigert ist, sodass sich das Gewicht der beiden Mausstämmen zu diesem Alterszeitpunkt angleicht.

Im Gehirn der 6 Monate alten B6mtNOD Tiere nähert sich die Expression der untersuchten Gene zwischen beiden Mausstämmen an. Die Expression der Pyruvatcarboxylase blieb jedoch, genau wie das ROS Level, gegenüber dem B6NTac Stamm erhöht und deutet auf einen weiterhin gesteigerten Substratumsatz hin.

Im Muskel der 6 Monate alten B6mtNOD Tiere zeigten sich keine Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Mausstämmen. Die ROS Bildung im B6mtNOD Stamm blieb jedoch weiterhin erhöht.

In der Leber der 6 Monate alten B6mtNOD Mäuse deuten die signifikant gesteigerte Pyruvatcarboxylase-Expression sowie die signifikant gesunkene UCP2-Expression auf einen erhöhten Substratumsatz hin. Die Expression der SOD2 ist im B6mtNOD Stamm im Vergleich zu B6NTac Mäusen vermindert. Unterschiede im ROS Level zwischen den beiden Mausstämmen konnten nicht aufgezeigt werden.

Bei den 12 Monate alten Tieren kam es in allen untersuchten Geweben zu deutlichen Unterschieden zwischen den beiden Mausstämmen. In den  $\beta$ -Zellen der B6mtNOD Mäuse kam es zu einem Anstieg der Tfam-Expression. Die gesteigerte SOD1- und UCP2-Expression weist auf eine erhöhte ROS Bildung durch notwendige Kompensation des mitochondrialen Stoffwechsels hin. Die verminderte Insulinsekretion der B6mtNOD Tiere könnte zudem eine Rolle für den höheren Glukosespiegel im Vergleich zur B6NTac Gruppe spielen.

Im Gehirn blieben die Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen bestehen. Auffällig war der Anstieg der Pyruvatcarboxylase gegenüber den B6NTac Mäusen. Des Weiteren konnte eine signifikant gesteigerte ROS Bildung im B6mtNOD Stamm gegenüber den 6 Monate alten Tieren und den gleichaltrigen B6NTac Mäusen ermittelt werden. Die Katalase-Expression stieg an, jedoch verblieb jene der SOD2 auf gleichem Niveau.

Im Muskel der 12 Monate alten B6mtNOD Mäuse war die Katalase-Expression vermindert, die der COX1 erhöht. In der Arbeitsgruppe konnte Jan Niemann ein zur Vergleichsgruppe gesteigertes ROS Level in den B6mtNOD Tieren nachweisen. Der altersabhängige Pyruvatcarboxylaseanstieg blieb im B6mtNOD Stamm aus, vermutlich als kompensatorische Antwort auf die gesteigerte ROS Produktion und Inflammation.

In der Leber der 12 Monate alten B6mtNOD Tiere fand sich ein altersabhängiger Anstieg an ROS, der tendenziell über dem der B6NTac Tiere lag. Vermutlich ist dies im Zusammenhang mit dem Anstieg der Expression für Pyruvatcarboxylase und der Abnahme an UCP2 im B6mtNOD Stamm zu sehen. Weiterhin zeigten die B6mtNOD Tiere einen, im Vergleich zu B6NTac Mäusen, deutlich geringeren Anstieg an SOD1. Es liegt hierbei genau wie im Gehirn, die Vermutung nahe, dass weitere antioxidative Enzyme und Proteine eine wichtige Rolle einnehmen, wie beispielsweise das DJ-1.

Die vorliegende Arbeit liefert deutliche Hinweise auf den Einfluss einer mtDNA Punktmutation auf altersabhängige Adaptationsvorgänge in den einzelnen Organen. Ob die ermittelten Effekte für die Cox3 Mutation spezifisch sind oder gleichermaßen auch durch andere mtDNA Mutationen verursacht werden, gilt es weiterführend zu klären.

### 7 Thesen

1. Die Cytochrom-c-Oxidase katalysiert in der Atmungskette die finale Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff.
2. Der konplastische Mausstamm C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> trägt einen nt9348A Polymorphismus in der mitochondrial kodierten Untereinheit Cox3 der Cytochrom-c-Oxidase.
3. Der C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Stamm wurde mit dem Hintergrundstamm C57BL/B6NTac hinsichtlich metabolischer Parameter und der Expression ausgewählter Gene verglichen.
4. Die Mutation innerhalb der Cox3 Untereinheit führt zu einem Defizit der Cytochrom-c-Oxidase mit verminderter Effizienz der gesamten Atmungskette im C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Stamm.
5. Durch unzureichende ATP-Generierung sowie gesteigerte ROS Bildung kommt es in den  $\beta$ -Zellen der B6mtNOD Mäuse zu einer Störung der glukosestimulierten Insulinsekretion mit Auswirkungen auf Gewicht und Blutzuckerspiegel der jeweiligen Tiere.
6. Im Gehirn von 3 Monate alten C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Tieren kommt es aufgrund der gestörten mitochondrialen ATP-Generierung schon sehr früh zu einer veränderten Genexpressionen sowie einem gesteigerten Substratumsatz.
7. Im Gehirn der C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Tiere ist bereits ab dem 3. Lebensmonat die mitochondriale ROS Bildung gegenüber dem C57BL/B6NTac Stamm erhöht, mit Auswirkungen auf die Expression antioxidativer Enzyme.
8. In der Leber der C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Tiere kommt es hingegen erst bei den 12 Monate alten Tieren zu einem Unterschied im ROS Level im Vergleich zum C57BL/B6NTac Stamm, mit Auswirkungen auf die Expression antioxidativer Enzyme.

9. In der Leber der 3 Monate alten C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Tiere scheinen Adaptationsvorgänge durch die Cox3 Mutation induziert zu werden, deren Rückkopplungsmechanismen weitergehend aufzuklären sind.
10. Bei den 6 Monate alten Tieren kommt es in Leber und Gehirn zu weiteren Adaptationsprozessen mit Angleichung der Genexpressionen zwischen den beiden untersuchten Mausstämmen, jedoch ist der Substratverbrauch der C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Mäuse weiterhin erhöht.
11. Im Gegensatz zu Leber und Gehirn konnten im Muskel der C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Mäuse erst bei den 12 Monate alten Tieren deutliche Unterschiede in der Genexpression und ROS Generierung im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt werden.
12. In allen Geweben zeigt sich bei den 12 Monate alten C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Tieren eine Dekompensation des Stoffwechsels mit Anstieg der intrazellulären ROS Produktion, die über jener des C57BL/6NTac Kontrollstamms lag.
13. Die Mutation in der mitochondrial kodierten Cox3 Untereinheit induziert im C57BL/6NTac-mt<sup>NOD/LtJ</sup> Mausstamm alters- und organabhängige Veränderungen, um das intrazelluläre Stoffwechseldefizit zu kompensieren.

### 8 Literaturverzeichnis

#### A

**Adina-Zada, A., Zeczycki, T. N. & Attwood (2012)** Regulation of the structure and activity of pyruvate carboxylase by acetyl CoA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **519**(2): 118-130

**Ashcroft, S.J.H., Bassett, J. M. & Randle, P. J. (1972)** Insulin Secretion Mechanisms and Glucose Metabolism in Isolated Islets. *DIABETES* **21** (Suppl. 2): 538-45

**Aumüller, G., Aust, G., Doll, A. et al. (2007)** Duale Reihe Anatomie. *Thieme-Verlag*, **2.2**: 740- 749

**Azzu, V. & Brand, M.D. (2009)** The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. **35**, No. 5

#### B

**Banerjee, M. & Vats, P. (2014)** Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Human Genetics*, **20**(1): 10-19

**Baltrusch S. & Tiedge, M. (2006)** Glucokinase Regulatory Network in Pancreatic  $\beta$ -Cells and Liver. *Diabetes Dec.*, vol. 55 no. Supplement 2 S55-S64

**Bai, J. & Cederbaum, Al. (2001)** Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol. Signals Recept*, **10** (3-4): 189-199

**Badenhoop, K., Ramos-Lopez, E. & Weyrich, P. (2011)** Klassifikation und Genetik. *Diabetologie in Klinik und Praxis*, Thieme Verlag, 6. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, **2**: 51-61

**Beattie, D.S. (2002)** Bioenergetics and oxidative metabolism. *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. Wiley-Liss 5. Edition, **13.3**: 547-557

**Berger, M. (2000)** Symptome, klinische Zeichen und diagnostisches Vorgehen bei Manifestation. *Diabetes mellitus*, Urban & Fischer Verlag, 2. Auflage, **23**: 275-279

**Bierhaus, A. & Nawroth, P.P. (1999)** Pathophysiologie diabetischer Spätschäden. *Kompendium Diabetologie*, Springer-Verlag, **2**: 34-81

**Bori, Z., Zhao, Z., Koltai, E., et al. (2012)** The effects of aging, physical training, and a single bout of exercise on mitochondrial protein expression in human skeletal muscle. *Experimental Gerontology*, **47**(6): 417-424

**Brandt, U. (2007)** Redoxreaktionen, Sauerstoff und oxidative Phosphorylierung. *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 8. Auflage, **15.1**: 490-505



**Brennan, L.A. & Kantorow, M. (2009)** Mitochondrial function and redox control in the aging eye: Role of MsrA and other repair systems in cataract and macular degeneration. *Experimental eye research*, **88**(2):195-203

**Brockington, A., Heath, P.R., Holden, H. et al. (2010)** Downregulation of genes with a function on axon outgrowth and synapse formation in motor neurones of the VEGF $\delta$ EGF $\delta/\delta$  mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Genomics*, **11**:203

### C

**Cabreiro, F., Ackerman, D., Doonan, R., Araiz, C., [...], & Gems, D. (2011)** Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine*, **51**(8): 1575-1582

**Carnero, A. & Paramio, J.M. (2014)** The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, Cancer Mouse Models. *Frontiers in Oncology*, **4**:252

**Chandel, N.S. (2010)** Mitochondrial Complex III: An essential component of universal oxygen sensing machinery. *Respiratory physiology & neurobiology*; **174**(3): 175-181

**Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P.C. (2004)** Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 61, Issue 2, pp 192-208

**Chen, J., Cammarata, P.R., [...], & Yager, J.D. (2009)** Regulation of Mitochondrial respiratory Chain Biogenesis by Estrogen/Estrogen Receptors and Physiologica, Pathological and Pharmacological Implications. *Biochemica et Biophysica acta*, **1793**(10): 1540-1570

**Clemens, A., Wahl, P., Klöppel, G. & Nawroth, P.P. (1999)** Typ-1-Diabetes. *Kompendium Diabetologie*, Springer-Verlag, **3**: 86-168

**Cook, C.C. & Higuchi, M. (2012)** The Awakening of Advanced Malignant Cancer: An Insult of the Mitochondrial Genome. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1820**(5): 652-662

**Copeland, W.C. (2012)** Defects in Mitochondrial DNA Replication and Human Disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*; **47**(1): 64-74

**Cypionika, H. (1999)** Grundlagen der Mikrobiologie. *Springer-Verlag*; **13**: 131- 145

### D

**Dargel, R. (1981)** Oxidative Phosphorylierung- Mitochondriale ATPase. *Mitochondrialer Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena; 1. Auflage; **3.7.**: 116-117

**Dawson, T.M. & Dawson, V.L. (2003)** Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*, **302**(5646): 819-822

**Deutzmann, R. (2006)** Insulin. *Duale Reihe Biochemie*, Thieme Verlag, **20.1.1**: 566-572

**Deutzmann, R. (2006)** Eikosanoide. *Duale Reihe Biochemie, Thieme Verlag*, **21.1**: 627-633

**Diaz, F., Kotarsky, H., [...], & Moraes, C.T. (2011)** Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Seminars in fetal and neonatal medicine*, **16**(4): 197-204

**Draznin, B. (2006)** Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Increased Expression of p85 $\alpha$  -The Two Sides of a Coin. *DIABETES*, vol. 55 no. 8: 2392-2397

**Dubois, R.N., Abramson, A.B., Crofford, [...], & Lipsky P.E. (1998)** Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal* vol. 12, **12**: 1063-1073

### F

**Fang, C., Jiang, Z. & Tomlinson, D.R. (1997)** Expression of constitutive cyclooxygenase (COX-1) in rats with streptozotocin-induced diabetes; effects of treatment with evening primrose oil or an aldose reductase inhibitor on COX-1 mRNA levels. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **56**(2): 157-63

**Flint Beal, M. (1999)** Mitochondria, NO and neurodegeneration. *Biochemical Society Symposium* **66**, 43-54

**Fontanesi, F., Soto, I.C., Horn, H. & Barrientos, A. (2006)** Assembly of mitochondrial cytochrome-c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **291**:C1129-C1148.

**Fontanesi, F., Soto, I.C. & Barrientos, A. (2008)** Cytochrome c Oxidase Biogenesis: New levels of Regulation. *IUBMB life*, **60**(9):557-568

**Fukai, T. & Ushio-Fukai, M. (2011)** Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, **15**(6):1583-1606

### G

**Galic, S., Klingler-Hoffmann, M., Fodero-Tavoletti, [...], & Tiganis, T. (2003)** Regulation of Insulin Receptor Signaling by the Protein Tyrosine Phosphatase TCPTP. *Mol Cell Biol.* 2003 March; **23**(6): 2096–2108

**Goldsteins, G., Keksa-Goldsteine, V., [...], & Koistinaho, J. (2008)** Deleterious role of superoxide dismutase in the mitochondrial intermembrane space. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(13): 8446-8452

**Gomes, E.C., Silva, A.N. & Rubino de Oliveira, M. (2012)** Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2012**: 756132

- Gowda, K., Zinnanti, W.J. & LaNoue, K.F. (2011)** The influence of diabetes on glutamate metabolism in retinas. *Journal of Neurochemistry*. **117**(2): 309-20
- Grarup, N., Sparsø, T. & Hansen, T. (2010)** Physiologic Characterization of Type 2 Diabetes–Related Loci. *Current Diabetes Reports*, **10** (6): 485-497
- Green, D.E., Kormann, E.F., Vanderkooi, G., Wakabayashi, T. & Valdivia, E. (1970)** Structure and function of the mitochondrial system. *Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts*, North-Holland Publishing Company, **1**: 1-17
- Gries, F.A. & Hauner, H. (2004)** Diabetes Mellitus Typ II. *Diabetes in der Praxis*. Springer Verlag, 3. Auflage, 7: 68-79
- Gunasekaran, U. & Gannon, M. (2011)** Type 2 Diabetes and the Aging Pancreatic Beta Cell. *Aging (Albany NY)*, **3**(6): 565-575
- Guzman, M., Halstead, S.B., Artsob, H., [...], & Peeling, R.W. (2010)** Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, **8**: 7-16
- H**
- Hamanaka, R.B. & Chandel, N.S. (2009)** Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxia signalling. *Current opinion in cell biology*, **21**(6): 894-899
- Hassel, B. & Brathe, A. (2000)** Neuronal Pyruvate Carboxylation Supports Formation of Transmitter Glutamate. *Journal of Neuroscience* **20**(4): 1343-1347
- Hayashi, Y. & Ueda, K. (1989)** The shape of mitochondria and the number of mitochondrial nucleoids during the cell cycle of *Euglena gracilis*. *Journal of Cell Science* **93**, 565-570 (1989)
- Hebert, S.L., Lanza, I.R. & Sreekumaran Nair, K. (2010)** Mitochondrial DNA Alteration and Reduced Mitochondrial Function in Aging. *Mechanisms of aging and development*, **131**(7-8):451-462
- Heidemann, C., Dr. Du, Y. & Dr. Scheidt-Nave, C. (2011)** Diabetes Mellitus in Deutschland. Hrsg. Robert Koch-Institut Berlin, GBE Kompakt **2**(3)
- Hekimi, S., Lapointe, J. & Wen, Y. (2011)** Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology*, vol.21, Issue **10**, pages 569-576
- Hemachandra Reddy, P., Tripathy, R., [...], & Manczak, M. (2012)** Abnormal Mitochondrial Dynamics and Synaptic Degeneration as Early Events in Alzheimer’s Disease: Implications to Mitochondria-Targeted Antioxidant Therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1822**(5):639-549

**Heni, M., Hennenlotter, J., [...], & Stenzl, A. (2012)** Insulin Receptor Isoform and B as well as Insulin Receptor Substrates-1 and -2 Are Differentially Expressed in Prostate Cancer. *PLoS ONE*, 7(12):e50953

**Herold, G. und Mitarbeiter (2010)** Innere Medizin. *Gerd Herold*, 9: 685-712

**Hirsch-Kaufmann, M. & Schweiger, M. (2006)** Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Georg Thieme-Verlag*, 6. unveränderte Auflage, 1.3.15: 39-42

**Hüttemann, M., Helling, S. [...], & Lee, I. (2012).** Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome *c* oxidase and cytochrome *c* in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817(4):598-609

### I

**Ibrahim, S. (2012)** Vortrag vom 09.10.2012

**Ichise, M. & Harris, P.E. (2010)** Imaging of  $\beta$ -Cell Mass and Function. *Journal of nuclear medicine*, 51 (7): 1001-1004

**Internationalen Diabetes Föderation (2011)** Aktuelle Zahlen und Trends aus der Gesundheitsberichterstattung des Bundes Diabetes mellitus in Deutschland. *Herausgeber Robert Koch-Institut, Berlin*. Stand: 06.05.2011

### J

**Jackson Laboratory (2013)** Description of Strain: C57BL/6J

**Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., [...], & MacDonald, M.J. (2010)** Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologica*, 53(6):1019-1032

**Johns, D.R. & Neufeld, M.J. (1993)** Cytochrome *c* Oxidase Mutations In Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 196: 810-815

### K

**Kaneto, H., Katakami, N., [...], & Matsuoka, T. (2010)** Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, 2010: 453892

**Kang, C. & Ji, L.L. (2012)** Role of PGC-1 $\alpha$  signalling in skeletal muscle health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1271 (1), 110-117

**Kaufmann, B.A., Durisic N. [...], & Shoubridge, E.A. (2007)** The Mitochondrial Transcription Factor TFAM Coordinates the Assembly of Multiple DNA Molecules into Nucleoid-like Structures. *Molecular Biology of cell*, 18(9): 3225-3236

- Kawamata, H. & Manfredi, G. (2010)** Import, Maturation, and Function of SOD1 and Its Copper Chaperone CCS in the Mitochondrial Intermembrane Space. *Antioxidants & Redox Signaling*, **13**(9):1375-1384
- Keightley, J.A., Hoffbuhr, K.C., Burtin, M.D., [...], & Kennaway, N.G. (1996)** A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria. *Nature genetics*, vol. **12**: 414-416
- Kellerer, M. & Häring, H.U. (2011)** Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des Typ-2-Diabetes. *Diabetologie in Klinik und Praxis*, Thieme Verlag, 6. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, **4**:73-84
- Kim, S.H., Suddath, F.L., Quigley, G.J., [...], & Rich, A. (1974)** Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science*, **185**(4149): 435-40
- Kim, Y.C. & Hummer, G. (2012)** Proton-pumping mechanism of cytochrome c oxidase: A kinetic master-equation approach. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1817**(4):536-536
- Klinge, C. M. (2008)** Estrogenic Control of Mitochondrial Function and Biogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* **15**, **105** (6), 1342–1351
- Klöppel, C., Michels, C., Zimmer, J., Herrmann, J.M. & Riemer, J. (2010)** In yeast redistribution of SOD1 to the mitochondrial intermembrane space protection against respiration derived oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **403** (1): 114-119
- Knippers, R., Philippsen, P., Schäfers, K.P., Fanning, E. (1990)** Molekulare Genetik. Thieme Verlag, 5. neu überarbeitete Auflage, **16**: 499-509
- Koene, S., Rodenburg, R.J., [...], & Smeitink, J.A.M. (2012)** Natural disease course and genotype-phenotype correlations in Complex I deficiency caused by nuclear gene defects: what we learned from 130 cases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **35**(5): 737-747
- Kojima, T., Dogru, M., [...], & Tsubota, K. (2014)** The effects of 3 % diquafosol sodium application on the tear functions and ocular surface of the Cu, Zn-superoxide dismutase-1 (SOD1)-knockout mice. *Molecular Vision*, **20**: 929-938
- Kolb, H. (2000)** Ätiopathogenese, inkl. Genetik. *Diabetes mellitus*, Urban & Fischer Verl., 2. Auflage, **20**: 247-252
- Kiselycznyk, C. & Holmes, A. (2011)** All (C57BL/6) mice are not created equal. *Frontiers in Neuroscience*. **5**: 10.

### L

- Leiter, E.H., Prochazka, M. & Coleman, D.L. (1987)** The non-obese diabetic (NOD) mouse. *American Journal of Pathology*, **128** (2): 380-383
- Lestienne, P., Bouzidi, M.F., Desguerre, I. & Ponsot, G. (1999)** Molecular Basis of Mitochondrial DNA Diseases. *Mitochondrial Diseases-Models ad Methods, Springer-Verlag*, **3**: 34-58
- Lezza, A.M., Pesce, V., Cormio, A., [...], & Gadaleta, M.N. (2001)** Increased expression of mitochondrial transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 in skeletal muscle from aged human subjects. *FEBS Letters*, vol. 501, Issue 1, Pages 74-78
- Li, S., Fu, Z.J. & Lo, A.C.Y. (2012)** Hypoxia-Induced Oxidative Stress in Ischemic Retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2012**: 436769
- Li, Y., D'Aurelio, M., Deng, J.H., [...], & Bai, Y. (2007)** An Assembled Complex IV Maintains the Stability and Activity of Complex I in Mammalian Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. **282**: 17557-17562
- Li, M.H., Cha, Y.N. & Surh, Y.J. (2006)** Peroxynitrite induced HO-1 expression via PI3K/Akt-depentent activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Free Radical Biology & Medicine*, **41**(7):1079-1091
- Li, Q., Sato, E.F., Zhu, X. & Inoue, M. (2009)** A simultaneous release of SOD1 with cytochrome c regulates mitochondria-dependent apoptosis. *Molecular and cellular Biochemistry*, **322**(1-2):151-159
- Lin, Y. & Sun, Z. (2010)** Current views of type 2 diabetes. *The journal of endocrinology*, **204**(1):1
- Löffler, G. (2007)** Aminosäuren. *Biochemie & Pathobiochemie, Springer-Verlag*, **8. Auflage**, **2.3**: 45-53
- Lorenzi, M. (2007)** The Polyol Pathway as a Mechanism for Diabetic Retinopathy: Attractive, Elusive, and Resilient. *Experimental Diabetes Research*, **2007**:61038
- Lüllmann-Rauch, R. (2006)** Bauchspeicheldrüse. *Taschenlehrbuch Histologie. Thieme Verlag*, **17.3**: 402- 407

### M

- Maahs, D.M., West, N.A., [...], & Mayer-Davis, E.J. (2010)** Chapter 1: Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, **39**(3), 481-497
- Mari, M., Colell, A., [...], & Fernández-Checa, J.C. (2010)** Redox Control of Liver Function in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, **12**(11):1295-1331

- Martelli, A., Napierala, M. & Puccio, H. (2012)** Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. *Disease Models & Mechanisms*, **5**(2): 165-176
- Mathews, C.K. & van Holde, K.E. (1990)** Biochemistry. *The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc.*, **15**: 522-523
- Masuyama, M., Iida, R., Takatsuka, H., Yasuda, T. & Matsuki, T. (2005)** Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissue during aging. *Biochemica and Biophysica Acta*, **1723** (1-3): 302-308
- McCoy, MK. & Cookson, MR (2012)** Mitochondrial quality control and dynamics in Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, **16**(9): 869-882
- Miao, L. & Clair, D.K. St. (2009)** Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases. *Free radical biology & medicine*, **47**(4):344-356
- Mick, D.U., Fix, Thomas D. & Rehling, P. (2011)** Inventory control: cytochrome oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **12**(1):14-20
- Milani, P., Ambrosi, G., Gammoh, O., Blandini, F. & Cereda, C. (2013)** SOD1 and DJ-1 Converge at Nrf2 Pathway: A Clue for Antioxidant Therapeutic Potential in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2013, Article ID 836760, 12 pages
- Minocherhomji, S., Tollefsbol, T.O. & Singh, K.K. (2012)** Mitochondrial regulation of epigenetics and its role in human diseases. *Epigenetics*, **7**(4): 326-334
- Müller-Esterl, W. et al. (2011)** Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Spektrum 2. Auflage*, **31.4**: 441-447 und **41.6**: 588-590
- Murphy, M.P. (2009)** How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochememical Journal*. **417**, 1-13
- N**
- Naini, A. & Shanske, S. (2007)** Detection of Mutations in mtDNA. *Methods in Cell Biology*, Vol. 80, **22**: 437-463
- Nass, M.M.K. (1976)** Mitochondrial DNA. *Molecular Genetics*; Vol. 5, **15**: 477-534
- Niemann, J., Johne, C., Wuchert, L., Koch, F., Tiedge, M. & Baltrusch, S. (2013)** An mtDNA mutation in the cytochrom-c oxidase impacts age-related processes in liver, muscle and brain. *Diabetologia*, **56**: suppl.

**Niizuma, K., Endo, H. & Chan, P.H. (2009)** Oxidative Stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *Journal of neurochemistry*, **109**(suppl 1):133-138

**Nomiyama, T., Yanaka, Y., [...], & Kawamori, R. (2003)** The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Journal of Human Genetics*, **48**:138-141

### O

**Ostergaard, E., Duno, M., Moller, L.B., Kalkanoglu-Sivri, H.S., [...], & Wibrand, F. (2013)** Novel Mutations in the PC Gene in Patients with Type B Pyruvate Carboxylase Deficiency. *JIMD Rep.* **9**: 1-5

### P

**Pantcheva, P., Elias, M., [...], & Kaneko, Y. (2014)** The role of DJ-1 in the oxidative stress cell death cascade after stroke. *Neuronal Regeneration Research*, **9**(15): 1430-1433

**Parakh, S., Spencer, D.M., [...], & Atkin, J.D. (2013)** Redox Regulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2013**: 408681

**Park, C.B. & Larsson, N. (2011)** Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *The Journal of Cell Biology*, **193**(5): 809-818

**Patel, S. & Santai, D. (2009)** Role of NF- $\kappa$ B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. *Pharmacological Reports*, **61**:595-603

**Percy, M.E. (1984)** Catalase: an old enzyme with a new role?. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **62** (10): 1006-14

**Pfeiffer, A.F.H. (2002)** Die verschiedenen Formen der Zuckerkrankheit und deren Genetik. *Grundlagen und Praxis, Diabetologie Kompakt, Blackwell Verlag*, 2., **1.3**: 11-18

**Pfohl, M. (2002)** Diagnostische Kriterien des Diabetes Mellitus und der gestörten Glucosetoleranz. *Grundlagen und Praxis, Diabetologie Kompakt, Blackwell Verlag*, 2., **1.4**: 19-23

**Pi, J., Zhang, Q., [...], & Anderson, M.E. (2010)** ROS signalling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **244**(1):77-83

**Picca, A., Pesce, V., [...], & Lezza, A.M.S. (2014)** A comparison among the tissue-specific effects of aging and calorie restriction on TFAM amount and TFAM-binding activity to mtDNA in rat. *Biochimica et Biophysica*. **1840** (7): 2184-2191



**Prentki, M., Matschinsky, F. M. & Murthy Madiraju, S.R. (2013)** Metabolic Signaling in Fuel-Induced Insulin Secretion. *Cell Metabolism*. Vol. **18**: 162-185

**Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y. & Tainer, J.A. (2000)** Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, vol. 296, Issue 1, Pages 295-309

### R

**Rains, J.L. & Jain, S.K. (2011)** Oxidative Stress, Insulin Signaling and Diabetes. *Free radical biology & medicine*, **50**(5): 567-575

**Rassow, J. (2006)** ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung. *Duale Reihe Biochemie, Thieme Verlag*, **10**: 164-182

**Rolo, A.P. & Palmeira, C.M. (2006)** Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **212**(2): 167-78

**Rotherman, S.M. (1999)** Mutations of the mitochondrial genome: clinical overview and possible pathology of cell damage. *Biochemical Society Symposium*, **66**, 111-122

### S

**Sachadyn, P., Zhang, X., Desquenette Clark, L., Naviaux, R. K. & Heber-Katz, E. (2008)** Naturally-Occurring Mitochondrial DNA Heteroplasmy in the MRL Mouse. *Mitochondrion*, **8**(5-6): 358-366

**Scarpace, P.J., Nicolson, M. & Matheny, M. (1998)** UCP2, UCP3 and leptin gene expression: modulation by food restriction and leptin. *Journal of Endocrinology*, **159**: 349-357

**Scherbaum, W.A. & Gries, F.A. (2004)** Diabetes Mellitus Typ I. *Diabetes in der Praxis*. Springer Verlag, 3. Auflage, **6**: 60-66

**Schleicher, E. & Landgraf, R. (2011)** Diagnose und Differentialdiagnose. *Diabetologie in Klinik und Praxis*, Thieme Verlag, 6. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, **5.1**: 86-87

**Seino, S., Shibasaki, T. & Minami, K. (2011)** Dynamics of insulin secretion and the clinical implications of obesity and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* Vol. **121** (6): 2118-2125

**Škrha, J. (2006)** Pancreatic Hormones and Hormonal Regulation of Insulin Secretion. Translation: Ludmila Višková; *ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH*, 145, No. 8

**Smith, P.M., Fox, Jennifer L. & Winge, D.R. (2012)** Biogenesis of the cytochrome bc1 complex and the role of assembly factors. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1817**(2): 276-286

- Smith, R.A.J., Hartley, R.C., Cochemé, H.M. & Murphy, M.P. (2012)** Mitochondrial pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol. 33, 6: 341-352
- Staiger, H., Stefan, N., Kellerer, M., Häring, H. (2007)** Die schnelle Stoffwechselregulierung. *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 8. Auflage, 26.1: 810-822
- Staiger, H. & Schleicher, E. (2011)** Einführung in die Biochemie und Pathophysiologie des Stoffwechsels. *Diabetologie in Klinik und Praxis*, Thieme Verlag, 6. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, 1.13: 41-50
- Starke, A.A.R. (2000)** Pathobiochemie, Pathophysiologie und Pathogenese der diabetischen Mikroangiopathien. *Diabetes mellitus*, Urban & Fischer Verl., 2. Auflage, 22: 264-274
- Starke, A.A.R. (2000)** Pathobiochemie, Pathophysiologie und Pathogenese des Stoffwechselsyndroms Typ-2-Diabetes. *Diabetes mellitus*, Urban & Fischer Verl., 2. Auflage, 34: 423 – 444
- Støy, J., Edghill, E. L., Flanagan, S. E., Ye, H., Paz, V. P., Pluzhnikov, A., Below, J. E. et al. (2007)** Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 104 no. 38: 15040-15044
- T**
- Tabrizi, S.J. & Schapira, A.H.V. (1999)** Secondary abnormalities of mitochondrial DNA associated with neurodegeneration. *Biochemical Society Symposium*, 66: 99-110
- Taconic Biosciences (2014)** C57BL/6 Background Model Description
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. & Lenzen, S. (1997)** Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, 46: 1733-1742
- Teriverdian, G. & Buselmaier, W. (2004)** Humangenetik. Springer-Verl., 3. Auflage, 9.9: 327- 333
- Thonpho, A., Rojvirat, P., Jitrapakdee, S. & MacDonald, M.J. (2013)** Characterization of the Distal Promoter of the Human Pyruvate Carboxylase Gene in Pancreatic Beta Cells. *PloS One*. 8(1): e55139
- Tiranti, V., Corona, P., Greco, M., [...], & Zeviani, M. (2000)** A novel frameshift mutation of the mtDNA COIII gene leads to impaired assembly of cytochrome c oxidase in a patient affected by Leigh-like syndrome. *Human Molecular Genetics*, 2000 Vol. 9, No. 18: 2733-2742

**Toyoda, Y., Erkut, C., & Kurzchalia, T.V. (2014)** Products of the Parkinson's disease-related glyoxalase DJ-1, D-lactate and glycolate, support mitochondrial membrane potential and neuronal survival. *Biology Open*, **3**(8): 777-784

**Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., [...], & Yoshikawa, S. (1996)** The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *SCIENCE*, Vol. **272**

### U

**Uchiumi, T. & Kang, D. (2011)** The role of TFAM-associated proteins in mitochondrial RNA metabolism. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1820**(2012): 565- 570

### V

**Vane, J.R., Bakhle, Y.S. & Botting, R.M. (1998)** Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. **38**: 97-120

**Vinogradov, A.D. (2008)** NADH/NAD<sup>+</sup> interaction with NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochimica et biophysica acta.*, **1777**(7-8): 729-734

**Voet, D. & Voet, J.G. (1995)** Biochemistry. John Wiley & Sons, INC.; second Edition; **20**: Section 20-3; page 587

### W

**Waldbaum, S. & Patel, M. (2010)** Mitochondrial Oxidative Stress in Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy research*, **88**(1):23-45

**Watanabe, K., Shibuya, S., [...], & Shimizu, T. (2014)** Superoxide Dismutase 1 Loss Disturbs Intracellular Redox Signalling, Resulting in Global Age-Related Pathological Changes. *BioMed Research International*, 2014: 140165

**Weiss, H., Wester-Rosenloef, L., Koch, C., [...], & Ibrahim, S. (2012)** The Mitochondrial Atp8 Mutation Induces Mitochondrial ROS Generation, Secretory Dysfunction, and  $\beta$ -Cell Mass Adaptation in Conplastic B6-mt<sup>FVB</sup> Mice. *Endocrinology*, **153**(10): 4666-4676

**Wellen, K.E. & Thompson, C.B. (2010)** Cellular metabolic stress: Considering how cells respond to nutrient excess. *Molecular cell*, **40**(2):323-332

**Whittaker, J.W. (2010)** Metal Uptake by Manganese Superoxid Dismutase. *Biochemica et biophysica acta*, **1804**(2):298

**Winge, D.R. (2012)** Sealing the Mitochondrial Respirasome. *Molecular ad Cellular Biology* **32**(14): 2647

### Y

**Yang, T.L., Francke, U. & Ullrich, A. (1985)** Gene for human insulin receptor: localization to site on chromosome 19 involved in pre-B-cell leukemia. *Science Magazine*, **228** (4700):728-731

**Yu, X., Gimsa, U., Wester-Rosenlöf, L., [...], & Ibrahim, S.M. (2009)** Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains. *Genome Research*. **19**(1), 159-165)

### Z

**Zamzami, N., Maisse, C., Métivier, D. & Kroemer, G. (2007)** Measurement of Membrane Permeability and the Permeability Transition of Mitochondria. *Methods in Cell Biology*, Vol. 80, Elsevier Inc., **16**: 327- 3400

**Zhang, L., Chan, S.S.L. & Wolff, D.J. (2011)** Mitochonrial Disorders of DNA Polymerase  $\gamma$  Dysfunction. *Archives of pathology & laboratory medicine*, **135**(7):925-934

**Zondler, L., Miller-Fleming, L., [...], & Outeiro, T.F (2014)** DJ-1 interactions with  $\alpha$ -synuclein attenuate aggregation and cellular toxicity in models of Parkinson's disease. *Cell Death & Disease*, **5**(7): e1350

**Zurita, E., Chagoyen, M., Cantero, M., Alonso, R., [...], & Montoliu, L. (2010)** Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Springer Science + Business Media B.V. Published online 27 May 2010*

**Zwiegers, P., Lee, G. & Shaw, C.A. (2014)** Reduction in hSOD1 copy number significantly impacts ALS phenotyps presentation in G37R (line 29) mice: implications for the assessment of putative therapeutic agents. *Journal of Negative Results in Biomedicine*, **13**:14

**Abkürzungsverzeichnis**

|                   |  |
|-------------------|--|
| Abb.              | Abbildung  |
| ADP               | Adenosindiphosphat                               |
| AGE               | Advanced- Glycation-Endproduct                   |
| ALS               | Amyotrophe Lateral Sklerose                      |
| ANOVA             | Analysis of variance                             |
| Arg               | Arginin  |
| ATP               | Adenosintriphosphat                              |
| BSA               | Bovines Serumalbumin                             |
| bzw.              | beziehungsweise                                  |
| ca.               | circa  |
| cAMP              | cyclisches Adenosinmonophosphat                  |
| cDNA              | komplementäre DNA                                |
| CO <sub>2</sub>   | Kohlenstoffdioxid                                |
| COX1              | Cyclooxygenase 1                                 |
| Ct                | Cycle of Treshold                                |
| CuA               | Kupfer A   |
| CuB               | Kupfer B   |
| cyt c             | Cytochrom c                                      |
| DAG               | Diacylglycerin                                   |
| DAF-16            | Insulin Receptor-like Gene                       |
| D-Loop            | displacement loop                                |
| dest.             | destillata                                       |
| d.F.              | der Fälle  |
| DDG               | Deutschen Diabetes Gesellschaft                  |
| DHU-Schleife      | Dihydrouracil-Schleife                           |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                           |
| EASD              | European Association for the Study of Diabetes   |
| e.g.              | exempli gratia = zum Beispiel                    |
| ELISA             | Enzyme Linked Immunosorbent Assay                |
| ETF               | Elektronentransferierende Flavoprotein           |
| FAD               | Flavin-Adenin-Dinukleotid                        |
| FADH <sub>2</sub> | reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid            |
| FELASA            | Federation of European Laboratory Animal Science |
| FMN               | Flavinmononuklotid                               |
| FoxO              | Forkhead box O                                   |
| GAPDH             | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase         |
| GFAT              | Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferase    |
| GLUT              | Glucosetransporter                               |
| GRB2              | Groth factor receptor-bound protein 2            |
| GSH               | $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin           |
| HNF-1- alpha      | hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A           |
| HNF-4- alpha      | hepatocyte nuclear factor 4 homeobox A           |
| HRP               | Meerrettich Peroxdiase                           |
| HSF-1             | Heat shock factor protein 1                      |
| HSP               | heavy-strand promoter                            |
| IDF               | Internationalen Diabetes Föderation              |
| IGF II            | Insulin-like growth factor II                    |
| iNOS              | induzierbare Nitrit-Oxidase-Synthase             |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |
|-------------------|---|
| IRS               | Insulinrezeptorsubstrat   |
| Leu               | Leucin  |
| LSP               | Light-strand promoter   |
| MafA              | v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A                                    |
| MAP-Kinase        | mitogen activated-protein kinase  |
| MELAS             | Mitochondriale Encephalopathie mit Laktazidose und schlaganfallähnliche Episoden            |
| MRL               | Murphy Roths Large  |
| mRNA              | messenger-RNA   |
| mt                | mitochondrial   |
| mtDNA             | Mitochondriale DNA  |
| mTOR              | mechanistic Target of Rapamycin   |
| mtTFA             | mitochondrial transcription factor  |
| m : w             | männlich zu weiblich  |
| n                 | Anzahl  |
| NAD               | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid  |
| NADH              | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)  |
| NADPH             | Reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat   |
| NF-κB             | Nukleärer Faktor-kappa B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) |
| NIH               | National Institute of Health  |
| NO                | Stickstoffmonoxid   |
| NRF-1             | Nuclear respiratory factor 1  |
| Nrf2              | Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2   |
| O <sub>2</sub>    | Sauerstoff  |
| OH <sup>•</sup>   | Hydroxylradikal   |
| OONO <sup>-</sup> | Peroxynitrit  |
| PBS               | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung   |
| PCG-α             | Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator alpha                          |
| PCR               | Polymerase Kettenreaktion   |
| PDK1              | Phosphoinositid-abhängigen Kinase   |
| PDX-1             | Pancreatic and duodenal homeobox 1  |
| PGE <sub>2</sub>  | Prostaglandin E <sub>2</sub>  |
| PGH <sub>2</sub>  | Prostaglandin H <sub>2</sub>  |
| PI3K              | Phosphatidylinositol-3-Kinase   |
| PIP2              | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat  |
| PIP3              | Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat   |
| PKC               | Proteinkinase C   |
| PS-Röhrchen       | Polytyrol-Röhrchen  |
| PTP               | Permeabilitäts-Transmissions-Poren  |
| Q                 | Ubiquinon   |
| QH <sub>2</sub>   | Ubiquinol   |
| qPCR              | Quantitative Echtzeit-PCR, siehe auch RT-PCR  |
| RAGE              | Rezeptor für AGE-Produkte   |
| RISP              | Rieske Eisen-Schwefel-Protein   |
| RNA               | Ribonukleinsäure  |
| RPMI              | RPMI 1640 / Kultivierungsmedium   |
| ROS               | reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygene species)                                       |
| rRNA              | ribosomale-RNA  |

## Abkürzungsverzeichnis

|              |   |
|--------------|---|
| RT-PCR       | Real-Time-PCR                               |
| SOD          | Superoxid-Dismutase                         |
| SOD1         | Superoxide Dismutase [Cu-Zn]                |
| SOD2         | Mangangebundene Superoxid Dismutase         |
| T1DM Typ I   | Diabetes mellitus Typ I                     |
| T2DM Typ II  | Diabetes mellitus Typ II                    |
| Tfam         | Transkriptionsfaktor A                      |
| TGF- $\beta$ | Transformierender Wachstums-Faktor- $\beta$ |
| TMB          | Chromogen-3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidine    |
| tRNA         | transfer-RNA                                |
| u.a.         | unter anderem                               |
| u. Ä.        | und Ähnliches                               |
| UCP2         | Uncoupling protein                          |
| UDP          | Uridin-Diphosphat                           |
| UDP-GlcNAc   | Uridin-Diphosphat - N-acetylglukosamin      |
| usw.         | und so weiter                               |
| UV-Licht     | Ultraviolettes-Licht                        |
| vergl.       | vergleiche                                  |
| vs.          | versus                                      |
| z.B.         | zum Beispiel                                |
| ZNS          | Zentrales Nervensystem                      |

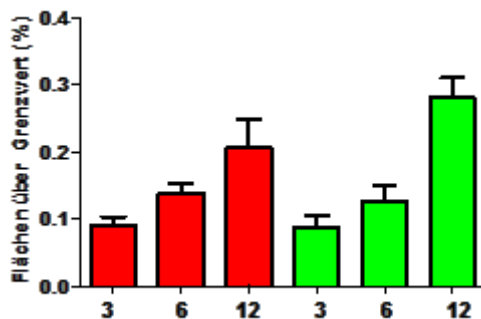
## Einheiten und Zeichen

|          |                       |
|----------|-----------------------|
| bp       | Basenpaare            |
| °C       | Grad celsius          |
| DA       | Dalton                |
| g        | Gramm                 |
| h        | Stunde                |
| Hz       | Herz                  |
| kb       | Kilobasen             |
| kDA      | Kilo-Dalton           |
| kJ       | Kilojule              |
| mg       | Milligramm            |
| ml       | Milliliter            |
| mM       | Millimolare           |
| mmol/l   | Millimol pro Liter    |
| nm       | Nanometer             |
| rpm      | revolution per minute |
| $\mu$ m  | Mikrometer            |
| &        | und                   |
| %        | Prozent               |
| $\infty$ | unendlich             |

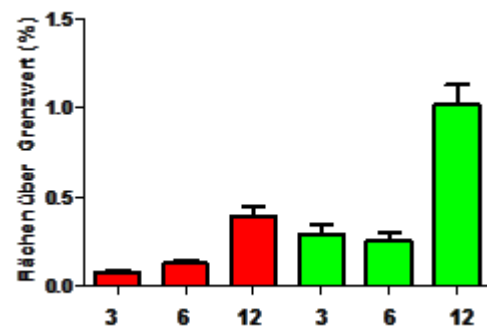
## Anhang 1: Quantifizierung der ROS Level

Ergebnisse von Jan Niemann aus der Arbeitsgruppe zur Quantifizierung der ROS Level zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten in Leber, Muskel und Gehirn von C57BL/6NTac- $mt^{NOD/LtJ}$  (B6mtNOD) und C57BL/6NTac (B6NTac) Mäusen (Niemann, J. et al. 2013). B6NTac und B6mtNOD Mäuse unterschiedlichen Alters wurden 25  $\mu$ g eines Superoxid-indikators MitoSOXTM (life technologies) 20 Minuten vor ihrem Tod injiziert. MitoSOXTM wird schnell durch Superoxidanionen in den Mitochondrien oxidiert. Das Oxidationsprodukt wird nach Bindung an Nukleinsäuren hoch fluoreszent.

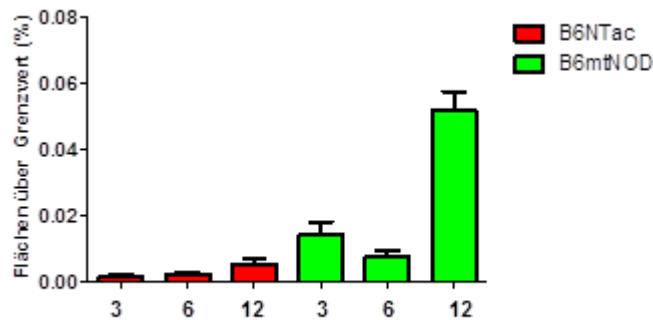
B Muskel



A Leber



C Gehirn



**Anhang 1: Altersabhängige mitochondriale ROS Bildung in Leber, Muskel und Gehirn von B6NTac und B6mtNOD Mäusen (A-C).** Es wurden 5  $\mu$ m dicke Gewebeschnitte mit dem Roti®-Mount FluorCare DAPI (Roth) eingebettet. Dabei erfolgte die gleichzeitige Anfärbung der Zellkerne mit DAPI. Der Anteil an ROS in den Geweben wurde mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops (Fluoview FV10i, Olympus) analysiert und mit der AutoQuant X Software (Media Cybernetics) ausgewertet.



## **Selbstständigkeitserklärung zur Dissertation**

Name: Wuchert-Wünnemann    Vorname: Lydia    Matrikelnummer: 7201780

Ich erkläre ausdrücklich, dass es sich bei der von mir eingereichten schriftlichen Arbeit mit dem Titel: „*Einfluss einer Cytochrom-c-Oxidase Mutation auf alterungsbedingte Adaptationsvorgänge im organspezifischen Zellstoffwechsel*“ um eine von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasste Arbeit handelt.

Ich erkläre ausdrücklich, dass ich sämtliche in der oben genannten Arbeit verwendeten fremden Quellen, auch aus dem Internet (einschließlich Tabellen, Grafiken u. Ä.) als solche kenntlich gemacht habe. Insbesondere bestätige ich, dass ich ausnahmslos sowohl bei wörtlich übernommenen Aussagen bzw. unverändert übernommenen Tabellen, Grafiken und Ähnlichem (Zitaten) als auch bei in eigenen Worten wiedergegebenen Aussagen bzw. von mir abgewandelten Tabellen, Grafiken u. Ä. anderer Autorinnen und Autoren (Paraphrasen) die Quelle angegeben habe.

Mir ist bewusst, dass Verstöße gegen die Grundsätze der Selbstständigkeit als Täuschung betrachtet und entsprechend der Prüfungsordnung und/oder der allgemeinen Satzung für Studien- und Prüfungsangelegenheiten geahndet werden.

Datum: Rostock, 05.12.2014

Unterschrift:

## **Danksagung**

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Großer Dank gebührt zuallererst Frau Prof. Dr. rer. nat. Simone Baltrusch, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter Ihrer Leitung durchzuführen. Ihre stets konstruktive Hilfe bei der Erstellung und Auswertung meiner Arbeit sowie Ihr offenes Ohr für Fragen haben mir sehr geholfen.

Ein ebenso großer Dank geht an Frau Dr. rer. nat. Cindy Johne für Ihre tolle Betreuung und ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Ihre Unterstützung bei Versuchen, der Auswertung dieser Arbeit sowie Formatierungsproblemen waren mir eine große Hilfe.

Weiterhin geht ein herzlicher Dank an das gesamte Team des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock für eine unkomplizierte Zusammenarbeit, stets konstruktive Anmerkungen und der souveränen Unterstützung bei der Bewältigung der Experimente und deren Auswertungen.

Abschließend möchte ich einen ganz großen Dank an meine Familie richten, für ihre uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung. Ich hab euch ganz doll lieb :)